Aus dem Institut für Pharmakognosie und Phytochemie
der Freien Universität Berlin

ECDYSONE und IRIDOIDE aus Vitex rubro-aurantiaca De Wild.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie

vorgelegt von

Eberhard Irion

aus München

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547206_0050

Aus dem Institut für Pharmakognosie und Phytochemie
der Freien Universität Berlin

ECDYSONE und IRIDOIDE aus Vitex rubro-aurantiaca De Wild.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie

vorgelegt von

Eberhard Irion

aus München

Referent: Professor Dr. H. Rimpler

Korreferent: Professor Dr. K. H. Frömming

Tag der mündlichen Prüfung: 18. NOV. 1975

Tag der Promotion:

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Rimpler durchgeführt.

Herrn Professor Dr. H. Rimpler möchte ich herzlich danken für die Anregung, das vorliegende Thema zu bearbeiten, für das Interesse, das er meiner Arbeit entgegengebracht hat und für die zahlreichen Ratschläge, die für mich wertvoll und anregend waren.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern am Institut für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Fräulein M. Schüler danke ich für das Zeichnen der Formeln und Herrn W. Bähr für die Ausführung der Fotoarbeiten.

Herrn G. Grelbig und Herrn J. Lindemann, Pharmazeutisches Institut der FU Berlin, danke ich für die Aufnahme der NMR- und Massenspektren.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	7
II. LITERATURTEIL	9
1. Botanische Charakterisierung von Vitex rubro-aurantiaca De Wild.	9
2. Chemische Merkmale der Verbenaceen unter besonderer Berücksichtigung der Gattung Vitex	12
2.1. Flavonoide	12
2.2. Ecdysone	14
2.3. Iridoide	14
2.4. Ätherische Öle	17
3. Ecdysone	18
3.1. Entdeckung und Aufgabe der Ecdysone im Tierreich	18
3.2. Vorkommen von Ecdysonen in höheren Pflanzen	21
3.3. Mögliche Funktion und Bedeutung von Ecdysonen in Pflanzen	25
3.4. Biologische Aktivität in Abhängigkeit von Strukturmerkmalen	26
3.5. Biosynthese der Phytoecdysone	27
4. Iridoide	27b
III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	29
Hauptteil	30
1. Isolierung	30
1.1. Extraktion und chromatographische Untersuchung der hydrophilen Inhaltsstoffe aus Blättern und Stengelteilen von Vitex rubro-aurantiaca De Wild.	30
1.2. Auftrennung der 1. Stoffklasse und Isolierung der Verbindungen VRA 1 - VRA 4	32
1.2.1. Isolierung der Verbindungen VRA 4 und VRA 3	33
1.2.2. Isolierung der Verbindungen VRA 2a und VRA 2b	33
1.2.3. Isolierung der Verbindungen VRA 1a und VRA 1b	34
1.3. Auftrennung und Isolierung der Verbindungen der 2. Stoffklasse	35

Seite

1.3.1. Isolierung der Verbindung VRA 5 35
1.3.2. Isolierung der Verbindung VRA 8 36

2. Identifizierung 36

2.1. Identifizierung der Verbindung VRA 4 36
2.2. Identifizierung der Verbindung VRA 3 44
2.3. Identifizierung der Verbindung VRA 2a 49
2.4. Identifizierung der Verbindung VRA 2b 54
2.5. Identifizierung der Verbindung VRA 1a 58
2.6. Identifizierung der Verbindung VRA 1b 63
2.7. Identifizierung der Verbindung VRA 5 76
2.8. Identifizierung der Verbindung VRA 8 77

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Experimenteller Teil 81

1. Allgemeine Angaben 81

1.1. Herkunft der Droge 81
1.2. Chromatographie 81
1.3. Spektroskopie 82
1.4. Schmelzpunktbestimmung - Gefriertrocknung 82

2. Spezielle Angaben 83

2.1. Isolierung 83

2.1.1. Extraktion der Droge und säulenchromatographische Abtrennung des hydrophilen Teiles 83

2.1.2. Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte aus Anteil sF und Anteil F 84

2.1.3. Isolierung der Verbindungen VRA 1 - VRA 10 85

2.1.3.1. Isolierung von Ecdysteron (VRA 4) und Polypodin B (VRA 3) sowie der Substanzgemische VRA 2 und VRA 1 86

2.1.3.2. Isolierung von Ajugasteron C (VRA 2a) und α-Ecdyson (VRA 2b) 87

2.1.3.3. Isolierung von Pterosteron (VRA 1a) und Muristeron A (VRA 1b) 88

2.1.3.4. Isolierung von Agnusid (VRA 5) 88

Seite

2.1.3.5. Isolierung von Aucubin (VRA 8) 89

2.2. Identifizierung 90

2.2.1. Eigenschaften von Pterosteron (VRA 1a) 90

2.2.2. Eigenschaften von Muristeron A (VRA 1b) 91

2.2.2.1. Bildung von VRA 1b-Diacetonid-Acetat 92

2.2.2.2. Eigenschaften von VRA 1b-Diacetonid-Acetat 93

2.2.3. Eigenschaften von Ajugasteron C (VRA 2a) 94

2.2.4. Eigenschaften von α-Ecdyson (VRA 2b) 95

2.2.5. Eigenschaften von Polypodin B (VRA 3) 96

2.2.6. Eigenschaften von Ecdysteron (VRA 4) 98

2.2.6.1. Säureabbau von VRA 4 99

2.2.6.2. Eigenschaften der Abbauprodukte 1 und 2 100

2.2.6.3. Bildung von VRA 4-Diacetonid 100

2.2.6.4. Eigenschaften von VRA 4-Diacetonid 101

2.2.7. Eigenschaften von Agnusid (VRA 5) 101

2.2.8. Eigenschaften von Aucubin (VRA 8) 102

V. DISKUSSION 103

VI. ZUSAMMENFASSUNG 107

VII. LITERATURVERZEICHNIS 109

VIII. LEBENSLAUF 113

I. EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Im Anschluß an die grundlegenden Arbeiten von BUTENANDT und KARLSON[35] sowie KARLSON und Mitarb.[37] und HUBER und HOPPE[38] über die Isolierung und Struktur der Insekten-Häutungshormone (Ecdysone), gelang es, diese Verbindungen in Pflanzen (vielfach als Phytoecdysone bezeichnet) nachzuweisen. Dadurch war es möglich, die chemotaxonomische Verwertbarkeit dieser Stoffgruppe zu diskutieren. Die Auswertung macht jedoch noch erhebliche Schwierigkeiten, da, wie inzwischen nachgewiesen, Ecdysone im Pflanzenreich weit verbreitet sind, wodurch taxonomische Zusammenhänge erschwert abgeleitet werden können. Es ist zu unterscheiden zwischen den Familien mit mehreren Gattungen ecdysonhaltiger Vertreter (dies ist z. B. bei den Amaranthaceae der Gattungen Achyranthes, Cyathula[50] und Bosea[97] der Fall) und den Familien, in denen ausschließlich Arten aus einer Gattung Ecdysone enthalten, wie z. B. die Gattung Stachyurus der Stachyuraceae[48]. In diese zweite Gruppe sind auch die Verbenaceen einzuordnen. Nur in der Gattung Vitex konnten bisher Ecdysone nachgewiesen werden, und zwar in den drei folgenden Arten: V. megapotamica (Spreng.) Moldenke[29][31], V. sereti De Wild. und V. rehmanni Gürke[25]. Obwohl dadurch noch nicht gesichert ist, daß weitere Vitex-Arten ebenfalls Phytoecdysone enthalten, können diese Ergebnisse als Hinweis dafür betrachtet werden.

Eine weitere Stoffgruppe mit möglicher chemotaxonomischer Bedeutung ist die der Iridoide, die allerdings innerhalb der Verbenaceae nicht nur auf die Gattung Vitex beschränkt ist.

Eine Sonderstellung nimmt jedoch das Agnusid ein, das in sämtlichen, bis heute dahingehend untersuchten Vitex-Arten, und meist begleitet von Aucubin, gefunden wurde[19)25)26)], nicht aber, und das trifft für beide Iridoide zu, in anderen Gattungen dieser Familie. Agnusid könnte sogar ein typisches Merkmal der Gattung Vitex sein. Es konnte, im Gegensatz zu Aucubin, sonst nicht im Pflanzenreich nachgewiesen werden.

Von den etwa 380 Vitex-Arten und -Unterarten sind acht auf Ecdysone und Iridoide hin untersucht. Dieser geringe Anteil genügt noch nicht für eine verwertbare taxonomische Beurteilung. Dies ist nur möglich, wenn durch Untersuchung weiterer Vitex-Arten nähere Kenntnisse über die Verbreitung dieser Verbindungen erhalten werden.

In der vorliegenden Arbeit werden die hydrophilen Inhaltsstoffe aus Vitex rubro-aurantiaca De Wild. auf die Anwesenheit von Ecdysonen und Iridoiden untersucht und die Ergebnisse im Hinblick auf eine eventuelle chemotaxonomische Verwertbarkeit diskutiert.

II. L I T E R A T U R T E I L

1. Botanische Charakterisierung von Vitex rubro-aurantiaca De Wild

Die Gattung Vitex wird nach BRIQUET[77] der Unterfamilie Viticoideae in der Familie der Verbenaceae zugeordnet. Das Hauptverbreitungsgebiet der etwa 380 Arten und Unterarten dieser Gattung ist die tropische und subtropische, östliche und westliche Hemisphäre, nur wenige finden sich in den gemäßigten Zonen Europas und Asiens. Die Gattung umfaßt größtenteils Bäume und Sträucher. Die Zweige sind meist mehr oder weniger deutlich vierkantig, die Blätter fast stets dekussiert und gegenständig oder dreiwirtelig. Sie setzen sich meist aus 3 - 7 ganzrandigen oder gezähnten, häutigen oder ledrigen Blättchen zusammen. Diese können gestielt oder sitzend, behaart oder kahl sein und einen lanzettlichen, elliptischen, eiförmigen oder verkehrt eiförmigen Umriß zeigen. Die Blüten sind zygomorph und zu zymösen Blütenständen vereinigt. Das Androeceum besteht aus vier Stamina. Das Pistill wird aus zwei zweifächerigen Karpellen gebildet und entwickelt sich zu einer Steinfrucht[78].

Die Art Vitex rubro-aurantiaca De Wild. ist ein in Zaire beheimateter Strauch mit im Alter zylindrischen, in jungem Zustand gegen die Internodien hin jedoch vierkantigen, unbehaarten Zweigen. Die Blätter sind gestielt und bestehen aus fünf gleichseitigen oder fast gleichseitigen, ganzrandigen, ebenfalls gestielten Teilblättchen, von denen die zentral stehenden immer stärker ausgebildet sind. Die Blattstiele sind unbehaart, 5 - 13 cm lang und auf der Oberseite deutlich rinnenförmig, die Stielchen sind ebenfalls unbehaart oder mit wenigen, anliegenden

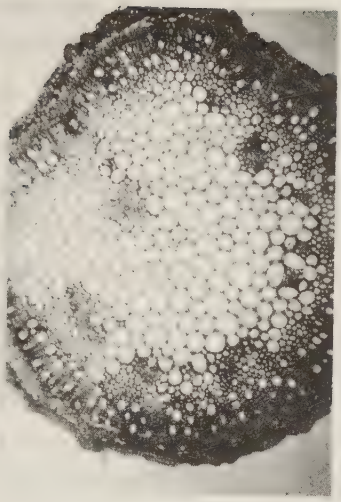
Härchen versehen. Die Blattspreite ist lanzettlich-elliptisch, 3,8 - 24 cm lang und 1,5 - 6,5 cm breit, mehr oder weniger stark zu einer bis zu 2 cm langen und feinen Spitze auslaufend und an der Basis keilförmig, unbehaart oder mit spärlicher Behaarung an den größeren Nerven der Unterseite.

Die wenig verzweigten axillären Infloreszenzen sind ungefähr 3 cm lang mit einem gemeinsamen 8 - 11 mm langen Stiel. Die Zymen sind locker, vielblütig, mit bis zu 2 mm langen fadenförmigen, samtigen Brakteen, die frühzeitig abfallen. Die spärlich samtig-behaarten Blütenstiele werden 3 - 4 mm lang. Der Kelch ist während der Blütezeit glockig, etwa 3 mm lang, an der Basis verengt, außen schwach zottig behaart, sehr kurz 5-zähnig und während der Fruchtzeit becherförmig ausgebreitet (etwa 9 mm Durchmesser), kleiner jedoch als die Steinfrucht.+)

Die Krone ist rot-orange oder gelb-orange, die kurze, gleichmäßig gebogene Röhre 8 - 10 mm lang, an der vom Kelch nicht bedeckten Außenseite und innen an der Ansatzstelle der Stamina samtig-behaart. Die vorderen der 5 Lappen sind etwa 3,5 mm lang und breit, die hinteren kürzer. Der Fruchtknoten ist eiförmig-rund und, abgesehen von einigen aufrechten Haaren zur Spitze hin, unbehaart[79)80)].

Die beschriebene Art wird nach PIEPER[78)] zu der Section Axillares in der Subgenus Euvitex PIEPER, der Subsection Cymosae und der Grex Glandulosae gerechnet.

+) Frucht und Fruchtkelch sind in der Literatur noch nicht beschrieben. Die Aussagen beruhen auf eigenen Beobachtungen. Das dafür verwendete Herbarexemplar wird im Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der FU Berlin aufbewahrt.



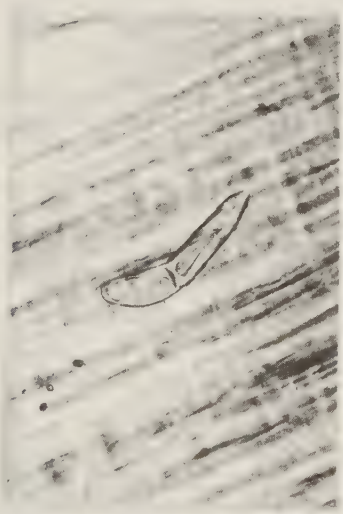


Abb. 1: a) Herbarbogen von Vitex rubro-aurantiaca De Wild.
b) Querschnitt durch den Blattstiel
c) Haartyp: Drüsenschuppe der Blattunterseite
d) Haartyp: kurzes, anliegendes Haar

2. Chemische Merkmale der Verbenaceen unter besonderer Berücksichtigung der Gattung Vitex

Die Familie der Verbenaceen ist bis heute nur sehr lückenhaft chemisch untersucht. Hauptsächlich einige der auffälligsten Arten wurden bearbeitet[2)]. Das mag wohl damit zusammenhängen, daß die medizinische Verwendung der einzelnen Drogen weitgehend lokal begrenzt blieb, obwohl eine beträchtliche Zahl von Arten in der Volksheilkunde gebräuchlich sind. Für den europäischen Raum sind nur zwei zu nennen, die jedoch von untergeordneter Bedeutung sind: Vitex agnus castus L., der Keuschlammstrauch, in der Antike das Sinnbild der Keuschheit, und Verbena officinalis L., das Eisenkraut. Beide werden hauptsächlich als Galaktagogum verwendet[1)].

Das chemische Spektrum der Verbenaceen umfaßt vorwiegend stickstofffreie Verbindungen. Nur in wenigen Fällen konnten Alkaloide oder cyanogene Verbindungen nachgewiesen werden, jedoch häufig mit ungenauen und nicht reproduzierbaren Angaben[3)]. So soll z. B. Vitex negundo L. ein Alkaloid Nishindin[4)] und Vitex trifolia L. Vitricin[5)] enthalten. Schwach cyanogen ist Vitex pubescens Vahl[6)]. Die nichtstickstoffhaltigen Inhaltsstoffe der Verbenaceen sind wesentlich genauer und ausführlicher untersucht.

2.1. Flavonoide

Bereits im vorigen Jahrhundert konnte aus Vitex lucens T. Kirk Vitexin und Isovitexin isoliert werden[7)]. Die Strukturaufklärung gelang jedoch erst ungefähr 60 Jahre später[8)9)].

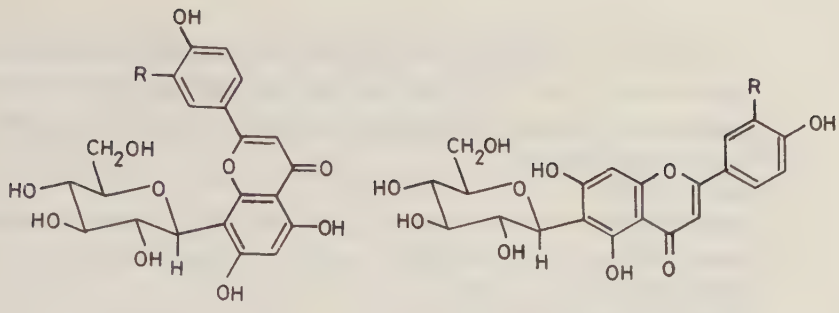
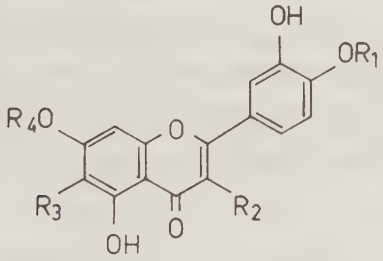


Abb. 2: Flavonoide aus Vitex-Arten

Inzwischen wurde Vitexin in verschiedenen Vitex-Arten nachgewiesen, daneben noch weitere Flavon-C-Glykoside wie Orientin und Isoorientin. Neben diesem Flavonoidtyp treten in Verbenaceen hauptsächlich noch Flavonglykoside und die für diese Familie sehr charakteristischen stark methylierten 6- oder 8-Hydroxyflavonole wie das Quercetagetinderivat Casticin auf.



	R_1	R_2	R_3	R_4
Luteolin	H	H	H	H
Casticin	CH_3	OCH_3	OCH_3	CH_3

Abb. 3: Flavonoide aus Vitex-Arten

	1	2	3	4	5	6	Lit.
Vitex agnus-castus				+	+	+	15,16,18,19,14
Vitex negundo				+	+	+	17, 19
Vitex trifolia				+	+	+	17, 19
Vitex lucens	+	+	+	+			7, 11, 12
Vitex altissima	+						10
Vitex leucoxylon	+						10
Vitex peduncularis	+						9
Vitex megapotamica			+	+	+		3, 15
Vitex rotundifolia						+	20

1 = Vitexin
2 = Isovitexin
3 = Orientin
4 = Isoorientin
5 = Luteolin-7-glucosid
6 = Casticin

Tabelle 1: Zusammenstellung der wichtigsten, bisher in Vitex-Arten nachgewiesenen Flavonoiden

Die außerhalb der Gattung Vitex in Verbenaceen gefundenen Flavonoide entsprechen weitgehend den hier beschriebenen Grundtypen, hauptsächlich dem der methylierten Flavonole, und werden daher im Rahmen dieser Arbeit nicht näher behandelt.

2.2. Ecdysone

Im Rahmen einer Arbeit über die sekundären Inhaltsstoffe dreier Vitex-Arten stieß SCHAAF[3)] bei Vitex megapotamica (Spreng.) Moldenke auf eine Substanz, die er als neuartiges, sauerstoffreiches Triterpen erkannte, deren Strukturaufklärung er jedoch

nicht zu Ende führte. Eine Nachprüfung und genauere Untersuchung erfolgte durch RIMPLER und SCHULZ[29]. Dabei zeigte sich, daß die Substanz aus mehreren Komponenten bestand. Die Hauptkomponente konnte als das erst kurz zuvor in Pflanzen nachgewiesene 20-Hydroxy-ecdyson identifiziert werden. Die Strukturaufklärung der Nebenkomponenten erbrachte Inokosteron[30], Pterosteron, Polypodin B und als neuartiges Ecdyson das Viticosteron E[31]. Bei phytochemischen Arbeiten konnte Ecdysteron (= 20-Hydroxy-ecdyson) von RIMPLER in zwei weiteren Vitex-Arten nachgewiesen werden: Vitex rehmanni Gürke. und V. sereti De Wild.[25]

Das Vorkommen von Ecdysonen scheint innerhalb der Verbenaceae auf die Gattung Vitex begrenzt zu sein. Triterpene in Form von Triterpenalkoholen, -ketonen, freien und veresterten -säuren, sowie Triterpensaponine und schwach hydroxylierte Sterine sind zum Teil in dieser Familie sehr verbreitet (vgl. R. HEGNAUER[32]).

2.3. Iridoide

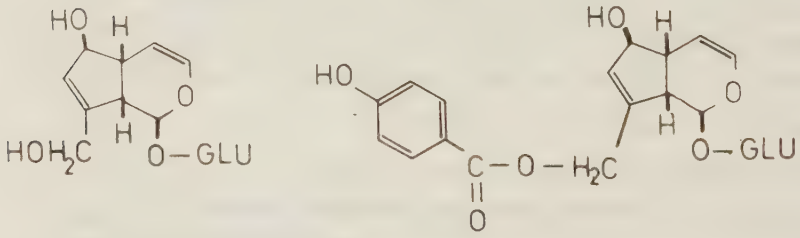
Zur gleichen Zeit, als aus Vitex lucens T. Kirk Vitexin isoliert wurde, beobachtete GRESHOFF[21] das Vorkommen von chromogenen Glucosiden (Pseudoindikanen) in verschiedenen Verbenaceen, darunter 6 Vitex-Arten: Vitex altissima, V. confassus, V. leucoxylon, V. Loureiri, V. negundo und V. trifolia. Viele der Arten wurden inzwischen genauer untersucht, und es konnte die Anwesenheit iridoider Glucoside bestätigt werden.
In Vitex-Arten sind bis heute nur zwei definierte Iridoide nachgewiesen worden: Aucubin und Agnusid.

	Agnusid	Aucubin	Lit.
Vitex agnus castus	+	+	22, 23
negundo	+	+	19, 24
trifolia	+	+	19, 24
lucens	+	+	19, 24
rehmanni	+	+	25
sereti	+		25
pseudo-negundo	+	+	25
megapotamica	+		26

Tabelle 2: Zusammenstellung der bisher in Vitex-Arten gefundenen Iridoide

Während Aucubin im Pflanzenreich sehr verbreitet ist - es wurde in mindestens 10 Familien nachgewiesen[27] - scheint das Agnusid für Verbenaceen spezifisch zu sein, vielleicht sogar für die Gattung Vitex selbst, da es außerhalb derselben noch nicht gefunden werden konnte.

Ein weiteres Hauptiridoid der Verbenaceen ist das bereits 1908



AUCUBIN AGNUSID

Abb. 4: Iridoide aus Vitex-Arten

aus Verbena officinalis L. isolierte Verbenalin[28]. Es wurde im Laufe der Zeit in mehreren Verbena-Arten nachgewiesen und ist identisch mit dem aus Cornaceen isolierten Cornin.

2.4. Ätherische Öle

Diese Stoffgruppe tritt in Verbenaceen relativ häufig auf. Beträchtliche Ölgehalte sind von Vertretern der Gattungen Lantana, Lippia, Premna und Vitex bekannt[33]. Die südamerikanische Art Lippia citriodora Kunth. liefert das echte Verbenaöl. Die Hauptbestandteile sind Monoterpenkohlenwasserstoffe, -aldehyde, -ketone und -alkohole, sowie Sesquiterpenkohlenwasserstoffe. In folgenden Vitex-Arten wurden ätherische Öle nachgewiesen und in ihrer Zusammensetzung untersucht: V. agnus castus L., V. trifolia L. und V. negundo L. Interessant in diesem Zusammenhang ist die von RIMPLER[15] beobachtete Korrelation zwischen einer Ätherisch-Öl-Produktion und dem Auftreten von lipophilen Flavonoiden (Casticin). In allen drei genannten Vitex-Arten konnte Casticin nachgewiesen werden, nicht jedoch in der drüsenhaar- und ätherischölarmen Vitex megapotamica (Spreng.) Moldenke.

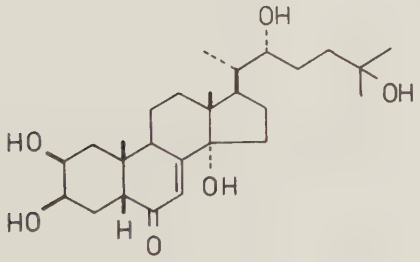
3. Ecdysone

3.1. Entdeckung und Aufgabe der Ecdysone im Tierreich

Die postembryonale Entwicklung der Insekten zu ausgewachsenen, geschlechtsreifen Tieren (Imago) führt über verschiedene Larven- und eventuell Verpuppungszustände. Zwischen jedem einzelnen Stadium tritt eine Häutung ein, d. h., die alte Chitinhaut wird abgeworfen und eine neue gebildet. Dieser Häutungs- und Metamorphoseprozeß wird hormonal kontrolliert und gesteuert. Durch die neurosekretorischen Zellen des Gehirns wird die Prothoraxdrüse angeregt,Häutungshormone freizugeben. Zur Erhaltung des larvalen Zustandes ist das Juvenilhormon der Corpora allata verantwortlich, es unterdrückt die Ausbildung des imaginalen Zustandes. Die Bildung von Puppe und Imago wird hauptsächlich durch das Häutungshormon ausgelöst. Wie stark die antagonistische Wirkung von Juvenilhormon und Ecdyson ist, haben kürzlich MASNER und HANGARTNER[87)] an Larven der Küchenschabe (Blattelle germanica) untersucht.

In gleicher Weise wie das endokrinologische Wissen, was die Häutungsvorgänge bei Insekten anbelangt, zunahm, wuchs das Bestreben, die Ursache dieser Entwicklungsstadien, d. h. die Natur der verantwortlichen Hormone zu erkennen. Die ersten aufwendigen Isolierungsversuche unternahm BECKER[34)], dem es 1941 gelang, einen verhältnismäßig wirkungsvollen Extrakt aus der Schmeißfliege, Calliphora erythrocephala, zu erhalten. Die Arbeit wurde von BUTENANDT und KARLSON[35)] aufgenommen und fortgeführt, später jedoch mit Seidenspinnerraupen (Bombyx mori). Nach zehn Jahren mühevoller Kleinarbeit gelang es ihnen, einen

Trennungs- und Reinigungsgang auszuarbeiten und eine kleine Menge einer Substanz, die sie Ecdyson nannten, in kristallisierter Form zu isolieren. Die Arbeiten zur vollständigen Strukturaufklärung erstreckten sich über weitere zehn Jahre. Zunächst konnten KARLSON und Mitarb.[36] folgende Strukturelemente sichern: Ecdyson ist ein C_{27}-Steroid mit der Summenformel $C_{27}H_{44}O_6$. Es enthält die Seitenkette des Cholesterins, eine α,ß-ungesättigte Ketogruppe im Ringsystem und fünf Hydroxylgruppen. Durch chemische Umsetzungen (Hydrierung, Perjodatoxidation, Säureabbau, Pyrolyse) und spektroskopische Methoden konnte die Lage der Enon-Gruppierung und weitgehend die der Hydroxyl-Funktionen festgelegt werden[37]. Parallel zu dieser Arbeit wurde von HOPPE und HUBER die Röntgenstrukturanalyse der Ecdysonkristalle durchgeführt. Sie erbrachte nicht nur die Bestätigung der von KARLSON und Mitarb. gemachten Ergebnisse, sondern darüber hinaus noch die Position der fehlenden OH-Gruppe und die sterische Anordnung der OH-Funktionen. Danach ist Ecdyson das 2ß,3ß,14α,22R,25-hydroxy-5ß-cholest-7-en-6-on[38].



α-ECDYSON

Während der Arbeiten zur Strukturaufklärung des Ecdysons isolierte KARLSON[39] aus dem Rückstand des Seidenspinnerextraktes eine zweite aktive Substanz, die er ß-Ecdyson benannte, das ursprüngliche Ecdyson somit α-Ecdyson.
Die Ausbeute war jedoch für eine Strukturaufklärung zu gering. HOCKS und WIECHERT[40] sowie HOFFMEISTER[41] isolierten 1966 die Substanz ebenfalls aus Seidenspinnerpuppen und erkannten sie als 20-Hydroxyecdyson bzw. Ecdysteron (HOFFMEISTER).

Im Jahre 1965 gelang einer australischen Gruppe[42] die Isolierung einer häutungsaktiven Substanz aus dem Panzerkrebs Jasus lalandei. Sie beschrieben sie als Crustecdyson. Es stellte sich jedoch heraus, daß sie mit ß-Ecdyson (20-Hydroxyecdyson, Ecdysteron) identisch ist[43]. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Bezeichnung Ecdysteron verwendet.
Aus dem gleichen Krebs konnte später noch ein weiteres Ecdyson isoliert werden, das 2-deoxy-ß-ecdyson[44], und aus Manduca sexta gelang die Isolierung von 20,26-dihydroxy-α-ecdyson[45].

In Insekten und Crustaceen ist die Konzentration von Ecdysonen äußerst gering. KARLSON isolierte aus 500 kg Bombyx mori-Puppen 25 mg α-Ecdyson und nur 2,5 mg ß-Ecdyson[39]. Das mag der Grund dafür sein, daß bis heute nur relativ wenig Ecdysone aus Tieren bekannt sind.
Im Gegensatz zu der systematischen und gezielten Forschung von KARLSON und Mitarb., war die Entdeckung der Phytoecdysone (häutungsaktive Substanzen aus Pflanzen) rein zufällig. So untersuchten NAKANISHI et al.[46] 1964 die Inhaltsstoffe von Podocarpus nakaii Hay, einer in China volksmedizinisch verwendeten, angeblich gegen Krebs wirksamen Droge. Eine krebsaktive

Substanz konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch isolierten sie vier häutungsaktive Produkte, die sie Ponasteron A, B, C und D nannten. Beinahe gleichzeitig untersuchten TAKEMOTO et al.[47] die Wurzeln von Achyranthes fauriei, einer in der orientalischen Medizin als Diuretikum verwendeten Amaranthacee. Sie isolierten ein Isomeren-Gemisch, bestehend aus Inokosteron und ß-Ecdyson. Es zeigte sich, daß die Ecdysone in manchen Pflanzen in einer weitaus höheren Konzentration enthalten sind, als in Insekten und Crustaceen.

3.2. Vorkommen von Ecdysonen in höheren Pflanzen

Das Auffinden von ecdysoneartigen Verbindungen in Pflanzen und die leichtere Isolierbarkeit daraus führte zu einer raschen Erforschung des Pflanzenreichs. Screening-Methoden wurden ausgearbeitet, bei denen zunächst nur die einzelnen Pflanzen auf ihre Häutungs-Aktivität untersucht wurden. Auf diese Weise konnten schon nach wenigen Jahren ungefähr 80 Familien ermittelt werden, die zumindest eine aktive Art enthalten[48]. Ein sehr großer Teil der bis heute gefundenen Phytoecdysone konnte aus Farnpflanzen (Pteridophyta) isoliert werden. Die Wahrscheinlichkeit, eine Häutungsaktivität nachzuweisen, ist in dieser Pflanzengruppe besonders hoch. In einer neueren Arbeit über die steroiden Inhaltsstoffe von japanischen Farnen erzielten TAKEMOTO und Mitarb.[49] in über 60 % der untersuchten Species aus 20 Familien ein positives Test-Ergebnis. Weiter wurden größere Mengen an Phytoecdysonen innerhalb der Spermatophyta bei der als Gymnospermae bezeichneten Gruppe gefunden, wobei die Podocarpaceae und die Taxaceae besonders zu erwähnen sind. Bei den Magnoliophytina (Angiospermae) ist das Auftreten von

häutungsaktiven Substanzen weniger häufig. In ungefähr 25 - 30 % der darin enthaltenen Familien, sowohl Magnoliatae als auch Liliatae, konnte bei mindestens einer Art eine Aktivität nachgewiesen werden[48]. Ein Teil dieser Pflanzen wurde inzwischen genauer untersucht und die darin enthaltenen Ecdysone isoliert und identifiziert. Von Interesse für die vorliegende Arbeit sind die bisherigen Untersuchungen über ecdysonartige Verbindungen aus Lamiaceae und Verbenaceae (Lamiales). Nur auf sie soll an dieser Stelle näher eingegangen werden.

Bei den Lamiaceen wurden Ecdysone nahezu ausschließlich aus Ajuga-Species bekannt. Die einzige bisher nachgewiesene Ausnahme ist die ägyptische Gamander-Art Teucrium polium L.[53], die jedoch mit Ajuga nahe verwandt ist. Das Spektrum der in den verschiedenen Arten gefundenen Ecdysone ist sehr ähnlich. In allen Fällen konnte das C_{29}-Steroid Cyasteron isoliert werden, das bis dahin nur aus der Amaranthaceae Cyathula capitata bekannt war[52].

	1	2	3	4	5	Lit.
Ajuga decumbens	+	+		+		51, 54
Ajuga incisa	+	+	+		+	51, 55
Ajuga nipponensis	+	+				51
Ajuga japonica	+	+		+		54
Ajuga chia	+					56
Ajuga turkestanica	+	+				57
Teucrium polium	+					53

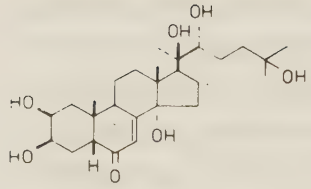
1 = Cyasteron
2 = Ecdysteron
3 = Ajugasteron B
4 = Ajugasteron C
5 = Polypodin B

Tabelle 3: Übersicht der aus Lamiaceae isolierten Ecdysone

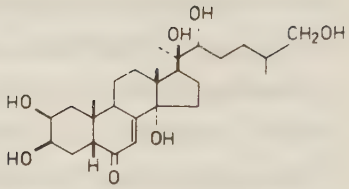
In den Verbenaceae, phylogenetisch den Lamiaceae verwandt, konnten aus verschiedenen Arten der Gattung Vitex Ecdysone isoliert werden, die alle das häufigere C_{27}-Grundgerüst enthalten: Ecdysteron, Inokosteron, Pterosteron, Polypodin B und Viticosteron E aus Vitex megapotamica[29)30)31)], Ecdysteron aus V. rehmanni und V. sereti[25)].

Von den bis heute gefundenen, etwa 40 verschiedenen Phytoecdysonen hat der größte Teil das vom Cholesterin abgeleitete C_{27}-Grundskelett. Der Rest sind C_{28}- und C_{29}-Ecdysone. Bei den Vertretern der C_{27}-Gruppe ist Ecdysteron am häufigsten im Pflanzenreich zu finden. Ebenfalls zu dieser Gruppe zählt das einzige, bis heute nachgewiesene Glucosid, das Ponasterosid A[58)], ein Ponasteron A-3ß-glucosid. Die drei bekannten C_{28}-Vertreter Makisteron A und B und Dacrysteron sind ausschließlich aus Podocarpaceae isoliert worden(neben C_{27}-und C_{29}[59)60)61)]). Wie bei den C_{29}-Ecdysonen entsteht auch hier die höhere Zahl der Kohlenstoffatome durch zusätzliche Verzweigung in der Seitenkette.

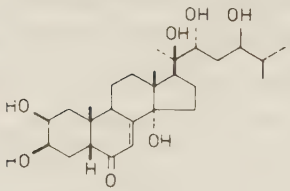
Die wichtigsten Merkmale des Ecdysonmoleküls sind folgende: das tetrazyklische Ringsystem enthält, von wenigen Ausnahmen abgesehen, eine 7-en-6-on-Gruppierung und Sauerstoff-Funktionen (OH) an den C-Atomen 2 (einzige Ausnahme ist Deoxycrustecdyson, ein Häutungshormon aus Crustaceen[62)]), 3 und 14. 2-OH und 3-OH stehen ß (Ausnahme ist das aus den Blättern von Podocarpus nakaii isolierte Ponasteron B[88)]: 2α,3α-OH), 14-OH ist α-ständig. Die Ringe A und B sind cis verknüpft (5-ß). Die Seitenkette an C-17 trägt an C-22 und mit Ausnahme von α-Ecdyson an C-20 eine Hydroxy-Gruppe. Zusätzliche OH-Funktionen können an folgenden Stellen lokalisiert sein: 5ß, 11α, 24,



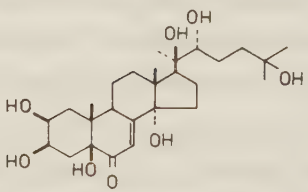
ECDYSTERON



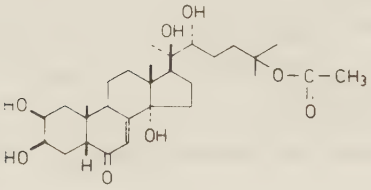
INOKOSTERON



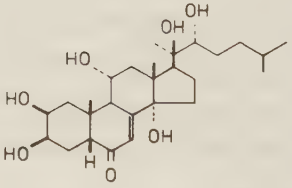
PTEROSTERON



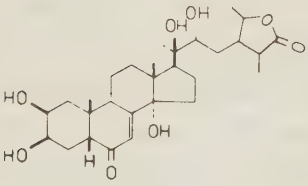
POLYPODIN B



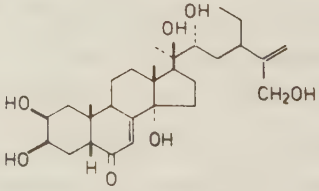
VITICOSTERON E



AJUGASTERON C



CYASTERON



AJUGASTERON B

Abb. 5: Verschiedene, bisher in Lamiales nachgewiesene Phytoecdysone

25, 26; weiter kann aus der Seitenkette ein Ring gebildet werden.

3.3. Mögliche Funktion und Bedeutung von Ecdysonen in Pflanzen

Über die Aufgabe von Ecdysonen in Pflanzen herrscht heute noch weitgehend Unklarheit, obwohl sich mehrere Arbeitsgruppen intensiv mit diesem Problem beschäftigt haben. So ist nicht mit Sicherheit bekannt, ob Ecdysone Endprodukte des Sterinmetabolismus sind oder ob sie eine physiologische oder biochemische Funktion für das Wachstum oder die Entwicklung der Pflanzen haben. Es ist möglich, daß Ecdysone von der Pflanze als Schutzstoff gegen Insekten-Schädlinge entwickelt wurden. Eine wichtige Frage in diesem Zusammenhang ist, ob mit der Nahrung aufgenommene Ecdysone aus dem Magen-Darmtrakt ins Blut absorbiert werden können. Große Mengen Ecdyson konnten in dem Kot von, hauptsächlich mit dem ecdysonhaltigen Farn Pteridium aquilinum gefütterten Wüstenheuschrecken (Schistocerca gregaria) nachgewiesen werden, während Häutung, Wachstum und Entwicklung der Tiere nicht beeinflußt wurden[68]. Dazu kommt, daß viele Insekten auf Pflanzen leben, die reich an Ecdysonen sind, wie z. B. die Seidenspinnerraupe Bombyx mori auf Maulbeerblättern[69]. Interessant hierbei ist, daß das Hauptecdyson dieser Pflanze, das Inokosteron, bisher nicht in Bombyx nachgewiesen werden konnte. Es wird vermutet, daß Insekten durch Enzyme in der Lage sind, Ecdysone zu inaktivieren, z. B. durch Glykosidierung[70], obwohl auf der anderen Seite angenommen wird, daß die hohe Aktivität von Ponasterosid A[58] durch enzymatische Hydrolyse zustande kommt.

3.4. Biologische Aktivität in Abhängigkeit von Strukturmerkmalen

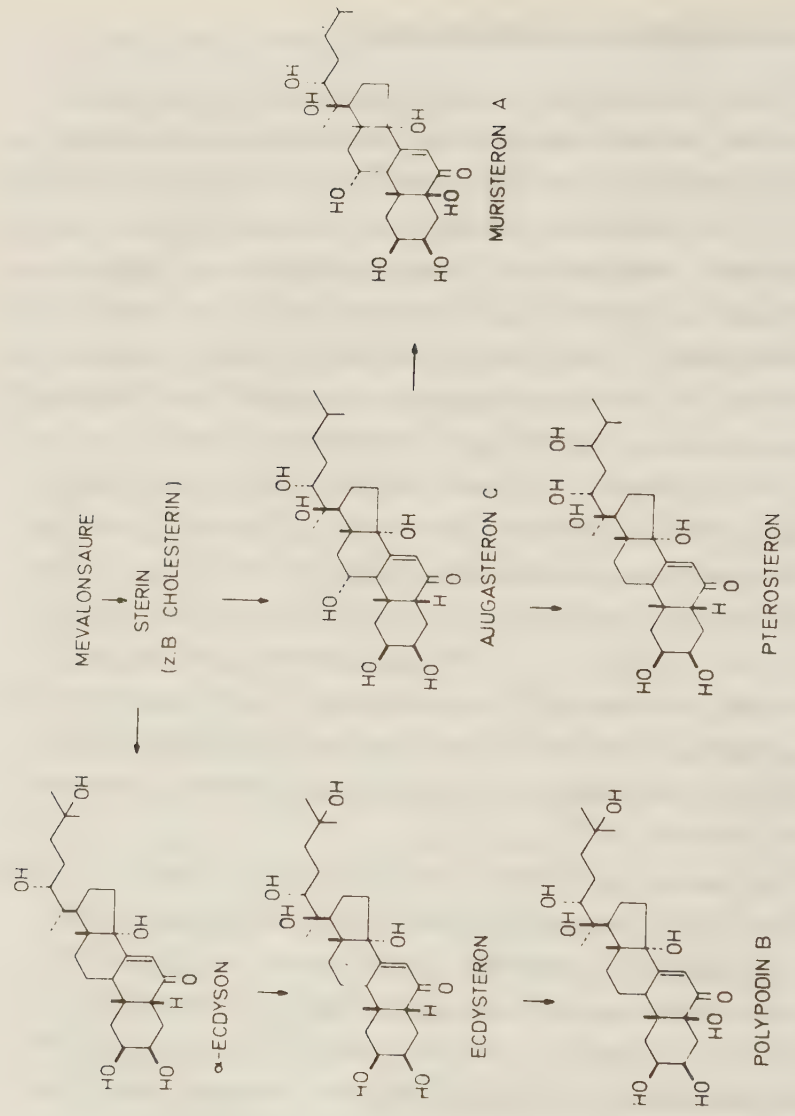
Es ist schwierig, eine genaue Korrelation zwischen Häutungsaktivität und Strukturmerkmalen bei Ecdysonen und dazu verwandten Verbindungen zu finden. Zu viele Faktoren spielen dabei eine Rolle und müssen berücksichtigt werden, wie die Verschiedenartigkeit der ausgearbeiteten Testmethoden und die Feststellung, daß unterschiedliche Ecdysone in verschiedenartigen Insekten zu verschiedenen Aktivitäten führen. Einige prinzipielle Aussagen können jedoch gemacht werden.

1. Durch eine Umkehr der Konfiguration an C-5 (A/B trans) wird eine völlige Inaktivität[64] erzielt, es kann sogar eine ecdyson-antagonistische Wirkung eintreten[63].
2. Das Fehlen der 14 α-Hydroxy-7-en-6-on-Gruppierung bzw. eines Teils davon führt ebenfalls zu inaktiven oder nur sehr schwach aktiven Produkten[65].
3. Eine Umkehr der Konfiguration des C-3-Hydroxyls hat eine starke Abschwächung der Aktivität zur Folge[66], während die Einführung einer 5ß-OH-Gruppe eine Zunahme bewirkt[67].
4. Die Seitenkette an C-17 kann in Grenzen variiert werden, ohne daß die Aktivität verloren geht. Wichtig scheint jedoch die Anwesenheit einer 22ß-Hydroxy-Gruppe zu sein, deren Fehlen, ebenso wie die Änderung der Stereochemie in der Seitenkette oder die Kürzung oder Herausnahme, zur Inaktivierung führt[63].
5. Eine Acetylierung in der Seitenkette wie bei Viticosteron E führt zu einer Verminderung der Aktivität[31].

3.5. Biosynthese der Phytoecdysone

Im Gegensatz zu Insekten besitzen Pflanzen die Möglichkeit, Sterine und somit auch Ecdysone biosynthetisch aus Mevalonsäure aufzubauen. DE SOUZA et al. bewiesen die Umwandlung von 2-^{14}C-Mevalonsäure in Ponasteron A und Ecdysteron in Eibenblättern (Taxus baccata)[81] und in Ecdysteron im Tüpfelfarn (Polypodium vulgare)[82]. Bereits 1963 erbrachten KARLSON und HOFFMEISTER[83] den Nachweis, daß in den Larven der Schmeißfliege Calliphora erythrocephala Cholesterin in Ecdyson umgewandelt wird. Dies führte zu der Vermutung, daß Cholesterin auch in Pflanzen als mögliche Vorstufe zur Ecdyson-Biosynthese verwendet wird. Bestätigt wurde dies, als SAUER[84] et al. aus Podocarpus elata radioaktives Ecdysteron isolierten, nachdem sie 4 Wochen lang die Pflanze mit 4-^{14}C-Cholesterin behandelt hatten. In Podocarpus macrophyllus führte die Behandlung zu aktivem Ponasteron A[85] und Ecdysteron[86]. Bei weiteren Untersuchungen an Polypodium vulgare gelang der Nachweis der Umwandlung von markiertem Cholesterin in α-Ecdyson, Ecdysteron und Polypodin B[82].

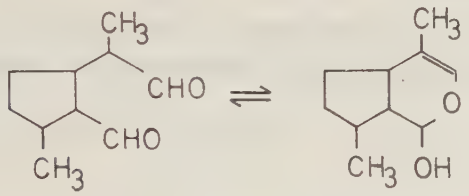
Über die biosynthetischen Zwischenprodukte herrscht noch weitgehend Unklarheit, ebenso über die Reihenfolge der Bildung der verschiedenen Ecdysone. Es wird jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen, daß α-Ecdyson eine kurzlebige Vorstufe der anderen C_{27}-Ecdysone darstellt[82]. Somit kann für einige Ecdysone der folgende mögliche Biosynthese-Weg vorgeschlagen werden:



Schema: Möglicher Biosyntheseweg verschiedener Phytoecdysone

4. Iridoide

Zu den Iridoiden gehört eine Gruppe von meist glykosidisch gebundenen, cyclopentanoiden Monoterpenen. Der Name wurde von BRIGGS und Mitarb.[71] anstelle der bis dahin gebräuchlichen Bezeichnung der Pseudoindikane vorgeschlagen, da der Grundkörper dieser Verbindungen dem Enol-Halbacetal des Iridodials (in Iridomyrmex-Arten) entspricht.



Iridodial Enolhalbacetal

Die Iridoide sind im Pflanzenreich in der Klasse der Magnoliatae sehr verbreitet. Die am längsten bekannten sind vor mehr als hundert Jahren erstmalig nachgewiesen worden. Cornin (= Verbenalin) wurde bereits 1835 von GEIGER[72] aus Cornus florida isoliert, Asperulosid konnte 1848 in Rubia tinctorum[73] und Rhinanthin (= Aucubin) 1868 in Alectorolophus hirsutus[74] gefunden werden. Die Strukturaufklärung dieser Verbindungen gelang jedoch erst als die modernen Methoden der Spektroskopie zur Verfügung standen.

Die Iridoide lassen sich in drei Gruppen einteilen, je nach der Anzahl der C-Atome des Aglykons[76]:

1. Verbindungen mit einem C_{10}-Gerüst (Verbenalintyp).
   Hierzu gehören z. B. die Iridoide Verbenalin, Asperulosid, Genipin (kein Glukosid), Loganin und Monotropein.
2. Verbindungen mit einem C_9-Gerüst.
   a) Es fehlt die Carboxylgruppe an C-4 Aucubintyp):
      Aucubin, Agnusid, Catalpol, Harpagid
   b) Es fehlt das C-Atom an C-9: Deutziosid (= Mentzelosid)[90] und Scabrosid[91].
3. Verbindungen mit einem C_8-Gerüst (Unedosidtyp). Es sind nur zwei Vertreter bekannt: Unedosid und Stilbericosid[75].

E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

H A U P T T E I L

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

HAUPTTEIL

1. Isolierung

1.1. Isolierung und chromatographische Untersuchung der hydrophilen Inhaltsstoffe aus Blättern und Stengelteilen von Vitex rubro-aurantiaca De Wild

Um vergleichende Aussagen über die Verteilung der hydrophilen Inhaltsstoffe von Vitex rubro-aurantiaca machen zu können, wurde die nicht zerschnittene Droge in Blätter und Stengelteile getrennt und parallel verarbeitet. Zur Herstellung der Extrakte wurden die Drogenanteile zerkleinert und zunächst mit Aethanol (96 %ig), dann mit Aethanol-Wasser (80 %ig) erschöpfend extrahiert. Die daraus gewonnenen, getrockneten und an Celite gebundenen Extrakte wurden zur Abtrennung der lipophilen Bestandteile über einer Celite-Säule mit Hexan/Methylenchlorid (1:1) eluiert, und nachdem das Eluat nur noch ganz schwach grün gefärbt war, folgte die Elution der mehr hydrophilen Bestandteile mit Methylenchlorid/Methanol (1:1). Da die gesuchten Verbindungen wegen ihrer relativ großen Polarität in Wasser gut löslich sind, konnte dieses für den folgenden säulenchromatographischen Trennungsschritt als Fließmittel verwendet werden. Als Adsorbens diente hier Aluminiumoxid. Es wurde so lange eluiert, bis die Lösung nur noch schwach gelb gefärbt war und keine UV-Aktivität bei einer Wellenlänge von 254 nm mehr zeigte. Die daraus erhaltenen Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch auf Fertigplatten Kieselgel F254 "Merck" mit dem Fließmittelgemisch Methylenchlorid/Methanol/Wasser im Verhältnis 75 : 25 : 2,5 (Fließmittel A1) unter-

sucht. Zur Sichtbarmachung der Flecke wurden die entwickelten DC-Platten mit einer aethanolischen Lösung von Vanillin-Schwefelsäure besprüht und kurze Zeit erhitzt. Es entstanden charakteristische Anfärbungen der einzelnen Flecke. Sie wurden mit den Arbeitsbezeichnungen VRA 1 bis VRA 10 belegt. Eine Übersicht des Spektrums zeigt die folgende Tabelle:

Arbeitsbezeichnung	Rf x 100	UV-aktiv	Anfärbung
VRA 1	60,5	+	bläulichgrün
VRA 2	56,0	+	blaugrün
VRA 3	53,0	+	grün
VRA 4	48,6	+	grün
VRA 5	40,6	+	lila
VRA 6	34,7	-	gelb
VRA 7	28,0	-	gelb
VRA 8	20,0	-	violett
VRA 9	12,7	-	hellbraun
VRA 10	6,7	-	braun

Tabelle 4: Die hydrophilen Inhaltsstoffe aus Vitex rubro-aurantiaca

Der Vergleich der beiden Extrakte zeigte keine sehr großen Unterschiede. Lediglich die Intensität der Verbindung VRA 8 war bei dem der Stengelteile wesentlich schwächer. Eine weitere parallele Aufarbeitung schien nicht sinnvoll; die Extrakte wurden vereinigt.

Das obige Spektrum kann in drei Stoffklassen eingeteilt werden:

1. VRA 1 - VRA 4
2. VRA 5 und VRA 8
3. die restlichen Verbindungen VRA 6, 7, 9 und 10.

Bei den Verbindungen der 3. Stoffklasse (VRA 6, 7, 9, 10) konnte keine chemische Verwandtschaft zu Ecdysonen und Iri-

doiden festgestellt werden. Es handelt sich wahrscheinlich um Zuckerverbindungen, die Strukturaufklärungen wurden jedoch nicht bis zu Ende durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wird somit nicht weiter auf diese Verbindungen eingegangen. Untersucht werden die Substanzen der 1. und 2. Stoffklasse.

1.2. Auftrennung der 1. Stoffklasse und Isolierung der Verbindungen VRA 1 bis VRA 4

Die geringen Unterschiede in den Rf-Werten erschwerten die Auftrennung und Isolierung der Verbindungen VRA 1 bis VRA 4 erheblich. Zunächst konnte mit dem System Kieselgel/Fließmittel A 2 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 80:20:2) eine, wenn auch nicht vollständige Abtrennung der Verbindungen VRA 4 und VRA 1 von VRA 3 und VRA 2 erreicht werden, eine Auftrennung des Substanzkomplexes VRA 2/VRA 3 war hier jedoch nicht möglich. Durch die Anwendung der Gelfiltration über Sephadex G25 gelang es, diese beiden Verbindungen zu trennen. VRA 3 konnte in geringen Mengen im Vorlauf fraktioniert aufgefangen und durch mehrmalige Wiederholung des Trennungsvorgangs angereichert werden. Auch bei den Fraktionen, die noch zusätzlich VRA 1 oder VRA 4 enthielten, wurde mit Sephadex G 25 eine Trennung erzielt. Es bildeten sich dann Fraktionen, die entweder VRA 4 und VRA 3 (Vorlauf) oder VRA 2 und VRA 1 (Nachlauf) enthielten. Die Schwierigkeit dieser Methode lag in der sehr geringen Auftrennung, so daß viele Trennschritte zur Anreicherung der Verbindungen nötig waren.

1.2.1. Isolierung der Verbindungen VRA 4 und VRA 3

Die Isolierung der Verbindung VRA 4 erfolgte, wie oben beschrieben, weitgehend durch säulenchromatographische Auftrennung an Kieselgel. VRA 3 wurde durch Sephadex (G 25) (Abtrennung von VRA 2 und VRA 1) in Kombination mit Kieselgel (Abtrennung von VRA 4) isoliert.

1.2.2. Isolierung der Verbindungen VRA 2a und VRA 2b

Eine Identifizierung der aus Abschnitt 1.2. gewonnenen Verbindung VRA 2 führte zu keinem Ergebnis. Obwohl die Aussagen aus den IR-, UV- und NMR-Spektren verwertet werden konnten, war es nicht möglich, die in dem Massenspektrum auftretenden Peaks einem vernünftigen Fragmentierungsschema zuzuordnen. So konnte mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß es sich bei VRA 2 um ein Mischprodukt handelt.

Die Substanz wurde in verschiedenen Fließmittelsystemen Dc getestet. Eine Auftrennung in zwei Flecke konnte durch das Verteilungssystem Butanol/Toluol/Wasser im Verhältnis 2 : 1 : 3 (Oberphase) erreicht werden (siehe Tabelle Nr. 5). Die zwei neuen Flecke wurden mit den Arbeitsbezeichnungen VRA 2a und VRA 2b belegt.

Es geht daraus hervor, daß dieses System zur Trennung der ganzen Stoffklasse auch ungeeignet ist, da sich nun andere Substanzen überlagern. Es könnte jedoch der ganze Komplex VRA 2a/2b/3 aufgetrennt werden.

	Rf x 100	UV-aktiv	Anfärbung
VRA 2 a	49,0	+	blaugrün
VRA 2 b	42,0	+	türkis, rot werdend
zum Vergleich			
VRA 1	49,0		
VRA 3	35,0		
VRA 4	36,0		

Tabelle 5: Auftrennung von VRA 2 in VRA 2a und VRA 2b

1.2.3. Isolierung der Verbindungen VRA 1a und VRA 1b

Wie bei VRA 2 war auch bei der Verbindung VRA 1 keine Identifizierung möglich. Die Werte der UV- und IR-Spektren stimmten gut mit denen überein, die für Ecdysone als charakteristisch gelten. Das NMR-Spektrum war voll interpretierbar und zeigte keine Anzeichen einer Mischfraktion. Trotz mehrerer Versuche gelang es jedoch nicht, ein einigermaßen, vor allem im Bereich des Molekülpeaks, interpretierbares Massenspektrum anzufertigen. So lag der Verdacht nahe, daß die Substanz nicht einheitlich war, was nach einiger Zeit dünnschichtchromatographisch bestätigt werden konnte.

Eine Auftrennung von VRA 1 in zwei Flecke gelang mit dem Fließmittel Aceton/Toluol im Verhältnis 4 : 1 (Fließmittel C). Die Flecke wurden mit den Arbeitsbezeichnungen VRA 1a und VRA 1b belegt und durch präparative Schichtchromatographie (dreimaliges Entwickeln) getrennt. Die Substanzen konnten im Mengenverhältnis von 9 : 1 (1a : 1b) isoliert werden. In der folgen-

den Tabelle sind die Zusammenhänge des DC-Spektrums dargestellt:

	Rf x 100	UV-aktiv	Anfärbung
VRA 1a	45,0	+	grün
VRA 1b	38,0	+	graugrün
zum Vergleich:			
VRA 2a	38,0		
VRA 2b	30,5		
VRA 3	25,0		

Tabelle 6: Auftrennung von VRA 1 in VRA 1a und VRA 1b

Auch das Fließmittel C eignet sich nicht zur Auftrennung der gesamten Stoffklasse. Hier überlagern sich die Verbindungen VRA 1b und VRA 2a.

1.3. Auftrennung und Isolierung der Verbindungen der 2. Stoffklasse

Die Abtrennung der Verbindungen der 2. (VRA 5 und VRA 8) von denen der 3. Stoffklasse erfolgte säulenchromatographisch an Kieselgel.

1.3.1. Isolierung der Verbindung VRA 5

Bei der Grobauftrennung des Gesamtextraktes konnte eine Fraktion erhalten werden, die neben VRA 5 noch die Verbindungen VRA 4, VRA 6 und VRA 7 enthielt. Durch wiederholte säulenchromatographische Trennungsschritte in dem System Kieselgel/Fließmittel A2 konnte die Verbindung VRA 5 rein isoliert werden.

1.3.2. Isolierung der Verbindung VRA 8

Aus der Grobauftrennung des Gesamtextraktes resultierte eine Fraktion mit den Verbindungen VRA 7, VRA 8, VRA 9 und VRA 10. Die Isolierung von VRA 8 erfolgte durch Säulenchromatographie an Kieselgel mit dem Fließmittel A1.

2. Identifizierung

Es wurden das UV-, IR-, NMR- und das Massenspektrum angefertigt.

2.1. Identifizierung der Verbindung VRA 4

Die IR- und UV-Spektren deuten auf ein αß-ungesättigtes Keton hin (IR: intensive Bande bei 1650 cm^{-1}; UV: Maximum bei 243 nm[36]). Weiter ist im IR eine C=C-Doppelbindung bei 1610 cm^{-1}, sowie eine starke OH-Bande bei 3400 cm^{-1} und weniger charakteristische C-H-Valenzschwingungen bei etwa 2900 cm^{-1} zu erkennen. Weitere Informationen werden erhalten, wenn man die Substanz mit verdünnter HCl behandelt. Sie absorbiert dann bei λ = 297 und 243 nm. Dünnschichtchromatographisch kann nachgewiesen werden, daß dieses zweite Maximum nicht durch das ursprüngliche αß-ungesättigte Keton verursacht wird. Zunächst entsteht durch Wasserabspaltung ein konjugiertes Dienon, das dann in ein Dien-System mit isolierter Carbonyl-Gruppierung übergeht. Durch diese Reaktion gelang P. KARLSON und Mitarb. 1964 der Beweis der 14-Hydroxy-7-en-6-on-Gruppierung in Ecdysonen[37]. Er stellte damals folgende Teilstrukturen auf:

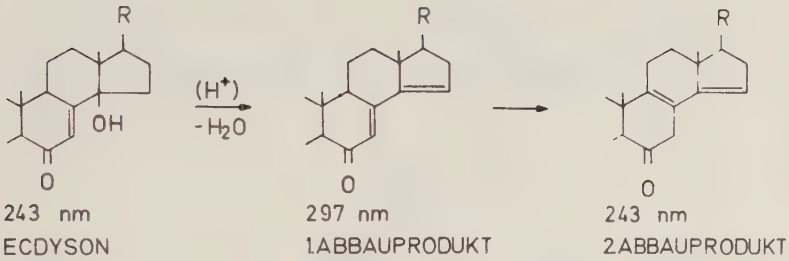


Abb. 6 : Abbaureaktionen von Ecdysonen bei Einwirkung von verdünnten Säuren

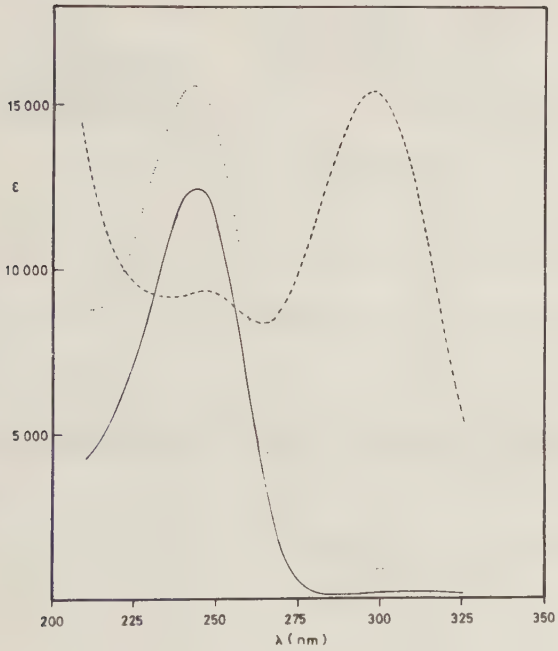


Abb. 7 : UV-Spektrum der Verbindung VRA 4 (——) und der Abbauprodukte 1 (- -) und 2 (•••)

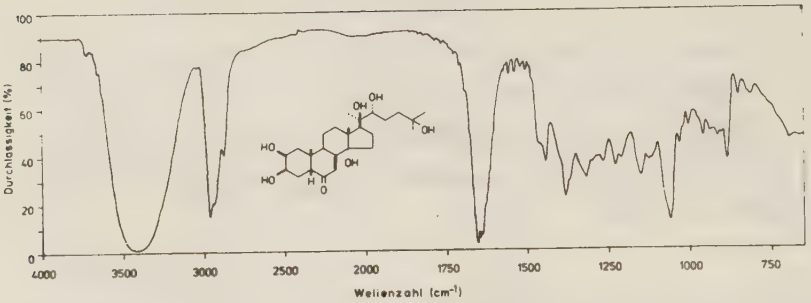


Abb. 8: IR-Spektrum der Verbindung VRA 4

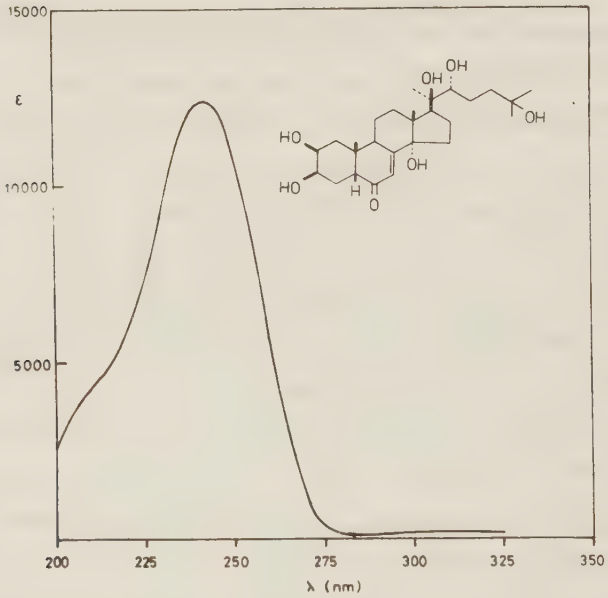


Abb. 9: UV-Spektrum der Verbindung VRA 4

Aus dem Massenspektrum erhält man verschiedene wichtige Informationen: Molekulargewicht, Anzahl der Hydroxygruppen mit Verteilung auf Grundkörper und Seitenkette, Art der Seitenkette. In dem Spektrum von VRA 4 ist ein deutlicher Molekülpeak bei m/e 480 zu erkennen, von dem viermalige Wasserabspaltung ausgeht. Durch M^+-117 bzw. M^+-117-18 entstehen die wichtigen Ionen

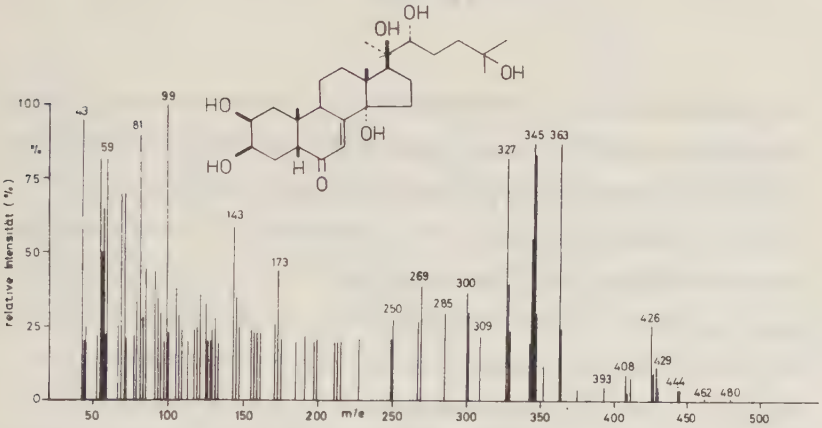
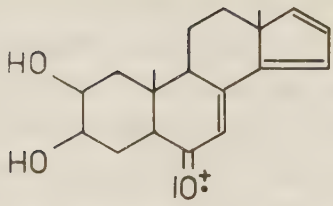


Abb. 10: Massenspektrum der Verbindung VRA 4

m/e 363 bzw. m/e 345 mit Wasserverlust bis m/e 309, die korrespondierenden Peaks der Seitenkette sind m/e 99 (M^+-363-18) und m/e 81 (M^+-363-36). Neben dieser C-20/22-Hauptfragmentierung sind im Spektrum Peaks vorhanden, die auf eine C-17/C-20-Spaltung zurückzuführen sind. Klar abgeleitet werden kann das Seitenkettenion mit m/e 143, m/e 300 jedoch entsteht aus M-H_2O durch thermische Spaltung[37] mit Wasserstoffübertragung und kann folgende Struktur besitzen:



m/e 300

Die Fragmentierung zu Bruchstücken mit ungeraden Massenzahlen, hier 363 und 345, zeigt an, daß die Spaltung zwischen C-20 und C-22 ohne Wasserstoffübertragung erfolgt ist. Dies ist der Fall bei Anwesenheit einer 20-Hydroxy-Gruppe[42]. Wie durch die Wasserabspaltungen deutlich wird, befinden sich an der Seitenkette noch zwei weitere OH-Funktionen und am Grundgerüst im ganzen drei. Somit kann gesagt werden, daß es sich bei VRA 4 um ein C_{27}-Ecdyson mit der Summenformel $C_{27}H_{44}O_7$ handelt.

Im NMR-Spektrum fallen die scharfen Signale bei hohem Feld besonders auf. Die Integration ergibt fünf CH_3-Gruppen, von denen zwei die gleiche Verschiebung haben. Der Normalwert für angulare Methylgruppen liegt bei etwa 0,9 ppm[89]. Dieser Wert trifft annähernd nur für ein Signal zu (δ = 1,06), das dem C-19 zugeordnet werden muß, während das C-18 durch den Einfluß der 20-Hydroxy-Gruppe etwas nach tieferem Feld verschoben wird und bei δ = 1,18 zu finden ist. Am stärksten entschirmt ist das C-21-Methyl; der Peak liegt bei δ = 1,55. Verursacht wird diese Verschiebung durch die Anwesenheit je einer Hydroxy-Gruppe an C-20 und C-22. Bei dem letzten Signal, den zwei überlagerten Singuletts, bei δ = 1,36 muß jede der beiden CH_3-Gruppen

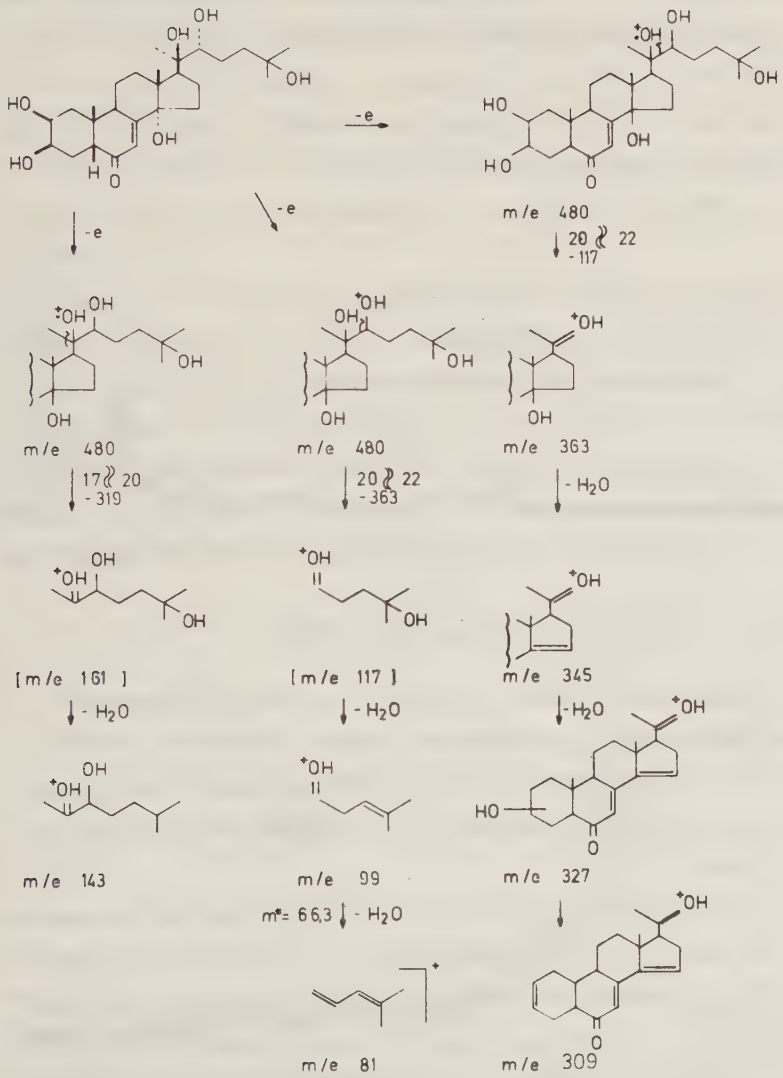


Abb. 11: Massenspektrometrischer Abbau von VRA 4

gleich stark entschirmt sein. Es kann stark vermutet werden, daß es sich um eine endständige Isopropyl-Gruppe handelt, wie dies bei Ecdysonen an C-25 üblich ist.

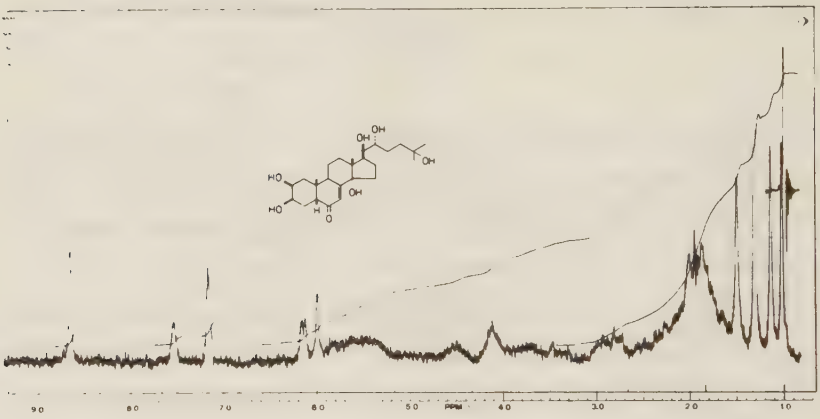


Abb. 12: NMR-Spektrum der Verbindung VRA 4

Ein auffallender Effekt tritt ein, wenn die Hydroxyprotonen zur Messung mit D_2O ausgetauscht werden. Während die C-19-, C-21- und C-26/27-Methylsignale ihre Lage nahezu beibehalten, wird das C-18- nach höherem Feld verschoben und erscheint bei $\delta = 0{,}94$.

Zwei wichtige Aussagen können noch aus dem NMR gemacht werden. Es befindet sich ein Dublett bei $\delta = 6{,}16$ und ein Singulett bei $\delta = 6{,}0$. Die Integration ergibt jeweils ein Proton. Da beide Signale stark entschirmt sind, ist eine direkte Nachbarschaft der funktionellen Gruppen zur Enon-Gruppierung wahrscheinlich. Das Singulett verschwindet nach D_2O-Zusatz. Es ist der OH-14

zuzuordnen, das Dublett mit J = 1,8 Hz dem C-7H. Die Aufspaltung wird durch allylische Kopplung mit dem Proton an C-9 verursacht[54]. Die restlichen Banden im NMR-Spektrum sind nicht auflösbar. Man kann einzelne Multipletts nur noch bestimmten Gruppen zuordnen. So befindet sich bei δ = 1,9 ein "Methylenberg", bei δ = 5,5 eine Anhäufung der Hydroxygruppen und bei δ = 4,13 die überlagerten Signale von zu OH geminalen Wasserstoffen.

Zur Sicherung und Festigung der bis hierher gewonnenen Daten wurde die Verbindung VRA 4 mit Aceton/Phosphorsäuremolybdän-Lösung umgesetzt. Das entstandene Diacetonid konnte unter normalen Bedingungen nicht acetyliert werden. Das NMR-Spektrum des Reaktionsproduktes enthält nur die neu hinzugekommenen Signale der Acetonid-Methylgruppen, jedoch kein Acetat-CH_3, das wesentlich stärker nach tieferem Feld verschoben wäre.

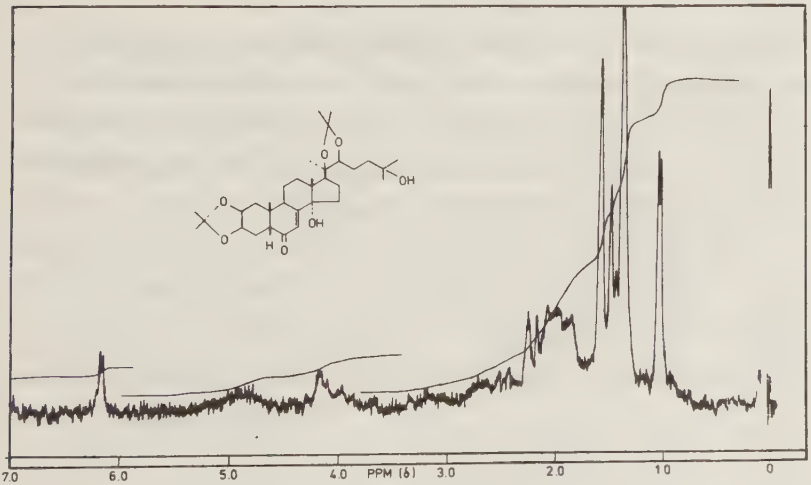


Abb. 13: NMR-Spektrum der Verbindung VRA 4-Diacetonid

Somit steht fest, daß neben den Hydroxygruppen an C-2, C-3 und C-22 keine weiteren primären oder sekundären OH-Funktionen vorhanden sind. Die Anzahl und die chemische Verschiebung der Methylsignale zeigt, daß es sich bei der Verbindung VRA 4 um ein im Grundgerüst unverändertes Ecdyson handelt. Das MS weist auf eine Hydroxy-Gruppe an C-20 hin. Die Doppelbindungs-Äquivalente sind durch das Ringsystem und die Enon-Gruppierung erschöpft. Durch die Nichtaufspaltung der beiden überlagerten Singuletts im NMR wird die Vermutung gefestigt, daß die Seitenkette an C-25 verzweigt ist und sich hier zusätzlich eine Hydroxy-Gruppe befindet. Der Vergleich mit der Literatur[46)40)29)] führt zu dem Ergebnis, daß es sich bei der Verbindung VRA 4 um Ecdysteron handelt, was durch Vergleich mit einem authentischen IR-Spektrum bestätigt wird.

2.2. Identifizierung der Verbindung VRA 3

Die verschiedenen Spektren von VRA 3 und VRA 4 zeigen große Ähnlichkeiten. Während im UV keine Unterschiede festzustellen sind - es muß sich daher um den gleichen Grundkörper handeln - fällt im IR die leichte Verschiebung der Enon-Banden auf: C=O bei 1682 cm^{-1}, C=C bei 1650 cm^{-1}.

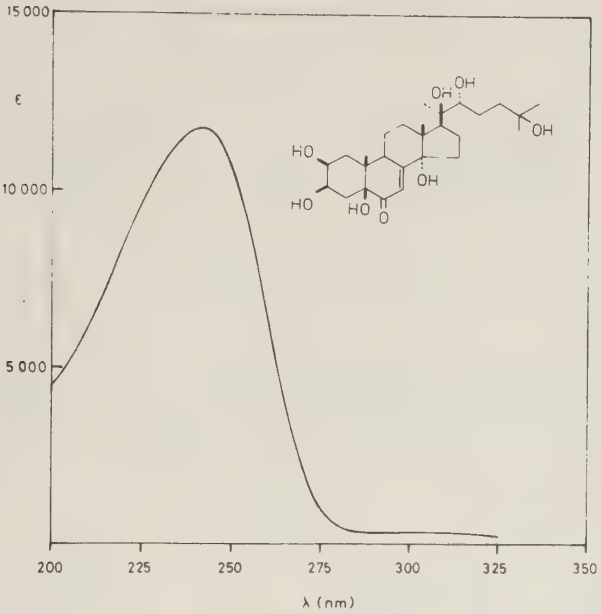


Abb. 14: UV-Spektrum der Verbindung VRA 3

Aus dem MS geht ganz eindeutig hervor, daß die Seitenkette unverändert geblieben ist. Es treten wie bei VRA 4 die Ionen m/e 99, m/e 81 und m/e 143 auf. Demgegenüber sind die Hauptpeaks des Grundskeletts um 16 Masseneinheiten erhöht: m/e 379, m/e 361, m/e 343 und m/e 325. Auch anstelle von m/e 300 tritt hier 316. Somit steht fest, daß im Grundkörper eine zusätzliche Sauerstoff-Funktion vorhanden ist. Nähere Angaben liefert das NMR-Spektrum.

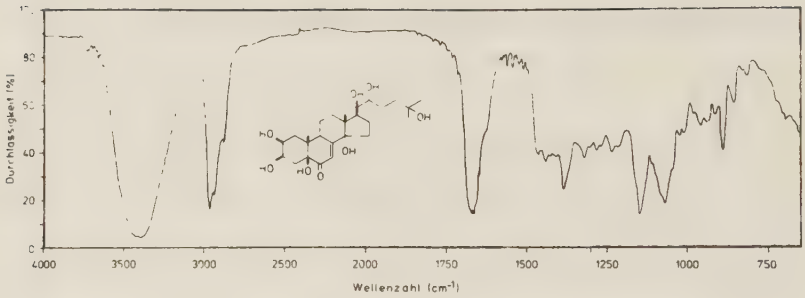


Abb. 15: IR-Spektrum der Verbindung VRA 3

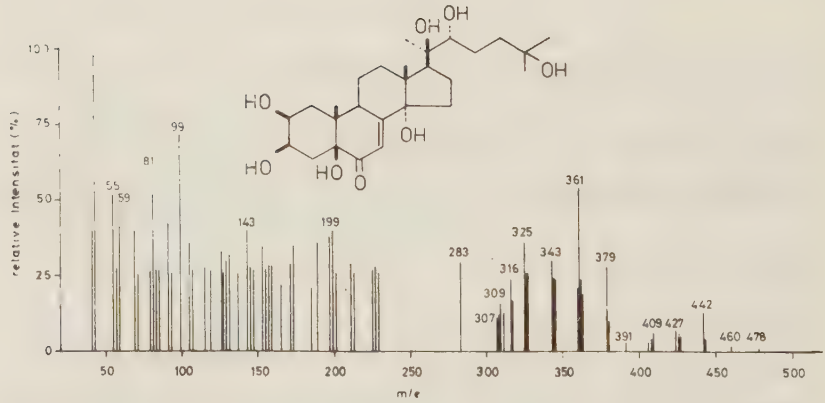


Abb. 16: Massenspektrum der Verbindung VRA 3

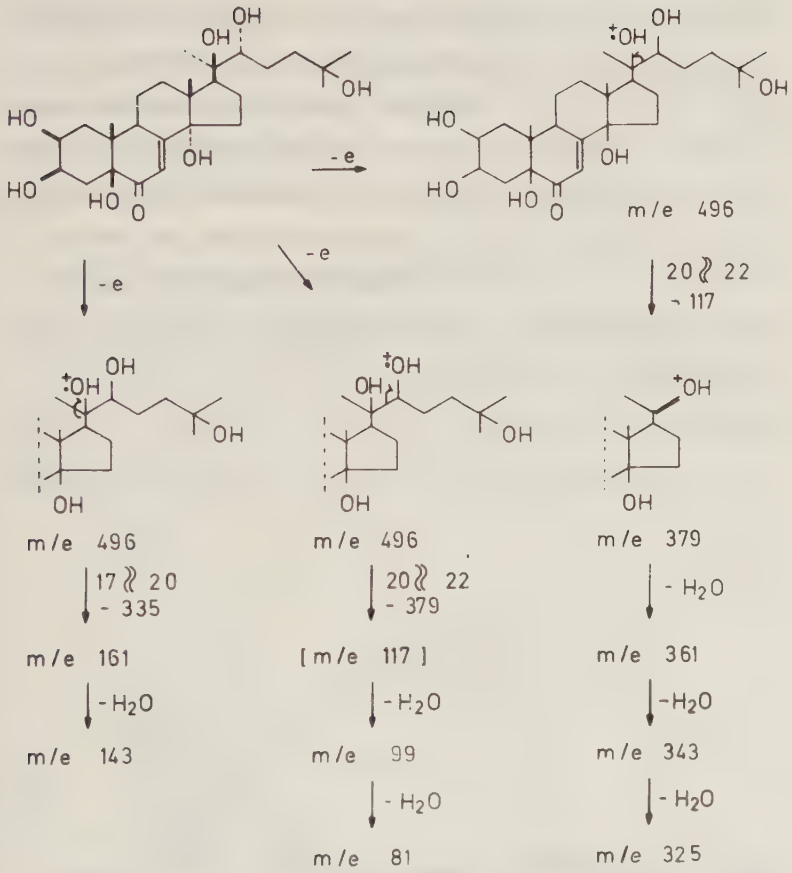


Abb. 17: Massenspektrometrischer Abbau von VRA 3

Die chemische Verschiebung der jeweiligen Methylgruppen von VRA 3 und VRA 4 ist nahezu identisch. Eine leichte Verschiebung von 0,03 ppm nach tieferem Feld ist bei C-19 zu beobachten. Der Wert liegt hier bei $\delta = 1{,}09$. Die wichtigste Information wird jedoch durch das Signal bei $\delta = 6{,}68$ erhalten. Es wird durch ein zusätzliches Hydroxy-Proton (kann mit D_2O ausgetauscht werden) verursacht. Aufgrund der Beobachtungen aus dem IR-Spektrum liegt die Vermutung nahe, daß diese OH-Gruppe in direkter Nachbarschaft zur Enon-Gruppierung steht. C-9 wird ausgeschlossen, da eine Kopplung mit C-7-H[54] ($J = 1{,}6$ Hz) vorhanden ist. In Frage dafür kommt nur das C-5.

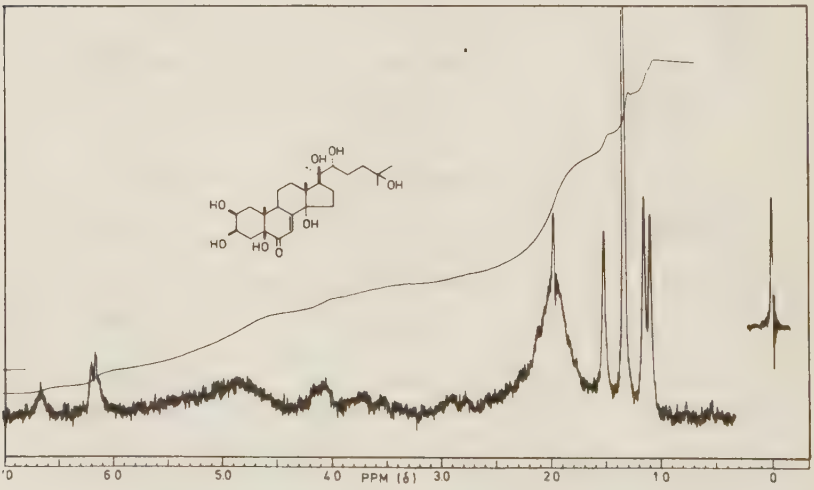


Abb. 18: NMR-Spektrum der Verbindung VRA 3

Es kann zusammenfassend gesagt werden, daß es sich bei der Verbindung VRA 3 um ein C_{27}-Ecdyson, mit einer, gegenüber

VRA 4, zusätzlichen Hydroxy-Gruppe an C-5, handelt. Die Ähnlichkeit der Spektren der beiden Verbindungen führt zu dem Ergebnis, daß VRA 3 mit dem 5ß-Hydroxyderivat des Ecdysterons, bereits aus mehreren Pflanzen isoliert[67)93)31)] und als Polypodin B bezeichnet, identisch ist. Ein Vergleich mit einem authentischen IR-Spektrum bestätigt die Identität.

2.3. Identifizierung der Verbindung VRA 2a

Die Grundstruktur der Ecdysone konnte aus den Spektren der Verbindung VRA 2a deutlich abgeleitet werden: Das Maximum im UV befindet sich bei λ = 241 nm, die IR-Banden der Enon-Gruppierung sind bei 1655 cm^{-1} und 1628 cm^{-1}. Aus dem MS geht hervor,

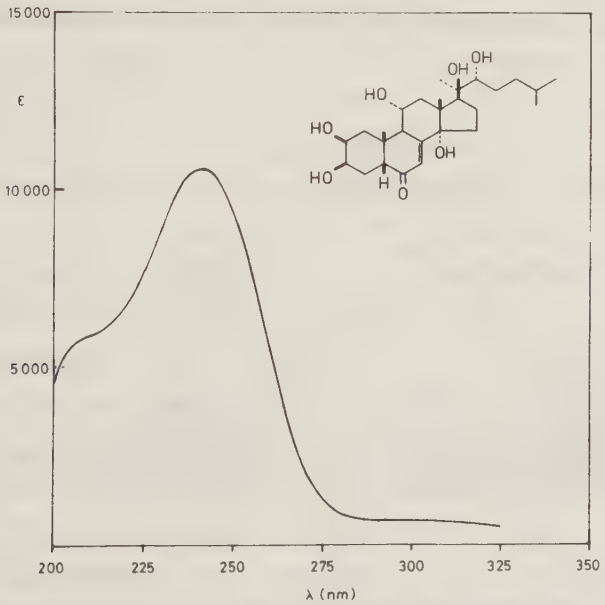


Abb. 19: UV-Spektrum der Verbindung VRA 2a

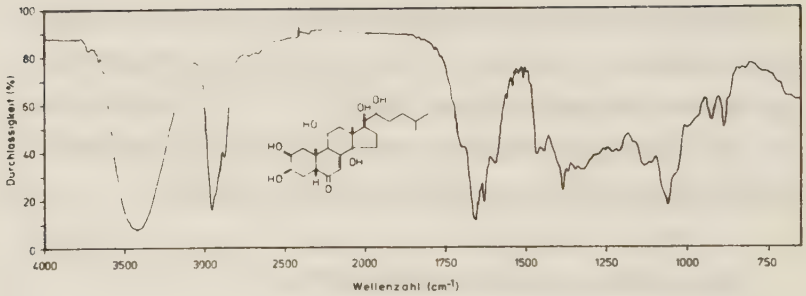


Abb. 20: IR-Spektrum der Verbindung VRA 2a

daß die Verbindung ein Isomeres von VRA 4 ist. Der Molekülpeak ist nicht vorhanden, dafür aber M^+-18 bei m/e 462. Die Wasserabspaltung setzt sich bis m/e 408 fort. Die weitere Fragmentierung unterscheidet sich stark von der des Ecdysterons.

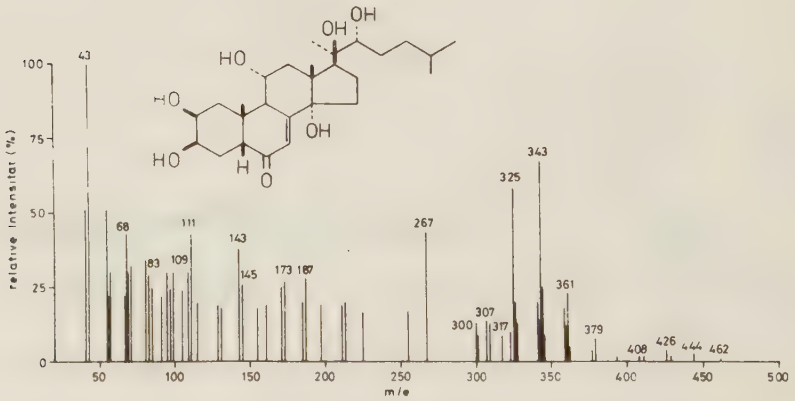


Abb. 21: Massenspektrum der Verbindung VRA 2a

Es treten im Grundskelett Ähnlichkeiten mit VRA 3 auf, d. h. eine Erhöhung von 16 Einheiten gegenüber VRA 4. Das Ion m/e 379 kann über vier Wasserabspaltungen zum m/e 307 verfolgt werden. Durch Abspaltung einer CH_3-Gruppe aus m/e 444 kommt es zum Peak m/e 429 und weiter durch H_2O-Verlust zu m/e 411 und m/e 393. Durch C-17/C-20-Spaltung entsteht die folgende Reihe: 317, 299, 281. Durch die Aufnahme einer Sauerstoff-Funktion im Grundskelett ist die Seitenkette um 16 Einheiten reduziert. Somit fällt auch das sonst führende Ion m/e 99 heraus. An seine Stelle tritt m/e 83. Durch die 17/20-Spaltung entstehen die Ionen m/e 145 und m/e 109. Die Hauptfragmentierung zu ungeraden Massenzahlen bestätigt das Vorhandensein einer C-20-OH.

In dem NMR-Spektrum von VRA 2a fällt auf, daß zwei Methylsignale nicht verschoben sind. Die Integration ergibt für diesen Bereich sechs Protonen, also zweimal CH_3. Dafür kommt nur C-26/27 in Frage, deren Protonen mit H-25 koppeln und zu einem dublettartigen Signal aufspalten. Die chemische Verschiebung von C-21-Methyl hat sich gegenüber VRA 4 und VRA 3 nicht verändert. Das Signal liegt bei $\delta = 1{,}53$. Die zwei restlichen Methylsinguletts müssen demnach den Protonen von C-18 und C-19 zugeordnet werden. Da der Wert von $\delta = 1{,}24$ nur geringfügig von dem für C-18-Methyl bei Ecdysteron ermittelten (in der Literatur sind hierfür Werte bis $\delta = 1{,}22$ angegeben[94]) abweicht, wird dieses Signal dem C-18 zugeordnet. Somit verbleibt für die C-19-Gruppe das Signal bei $\delta = 1{,}30$. Diese starke Verschiebung nach tieferem Feld besagt, daß die zusätzliche Hydroxygruppe in Nachbarschaft zu C-19 lokalisiert sein

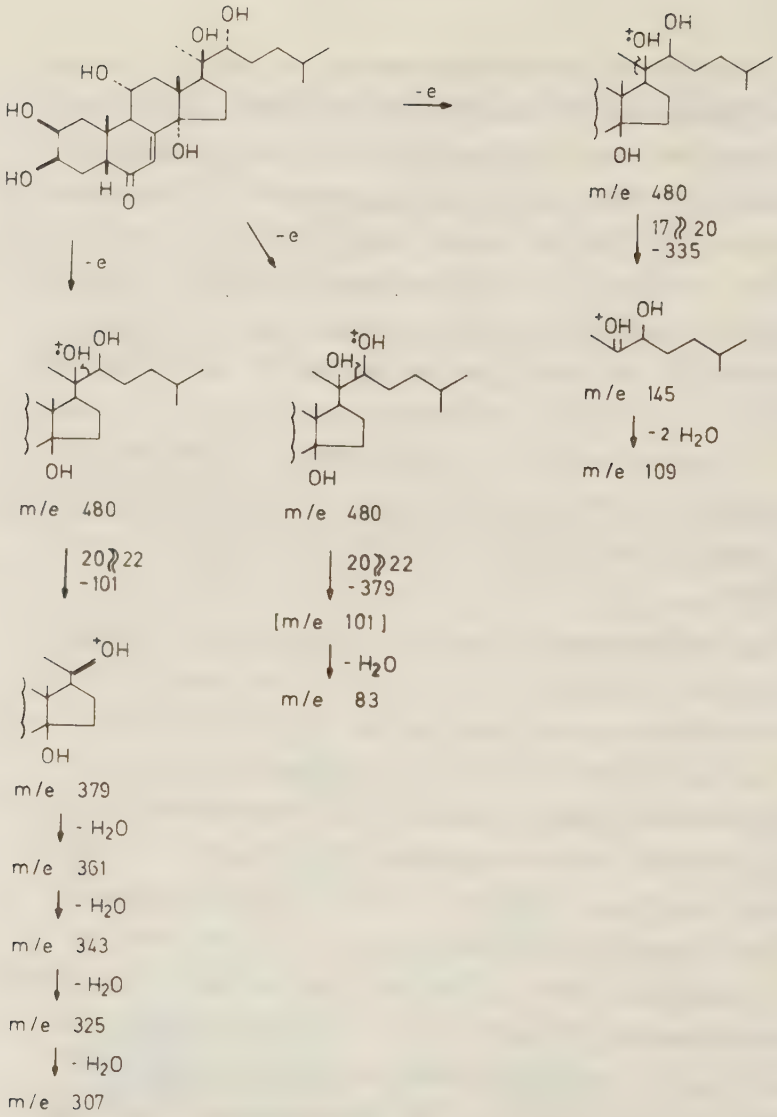


Abb. 22: Massenspektrometrischer Abbau von VRA 2a

Abb. 22: Massenspektrometrischer Abbau von VRA 2a

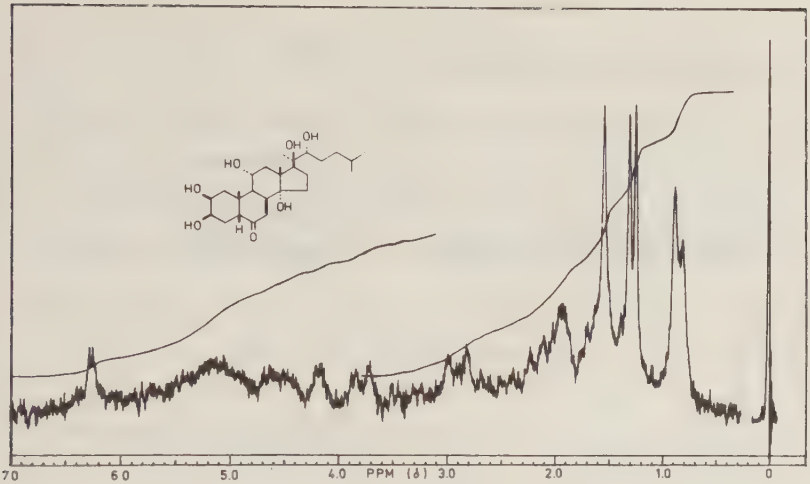


Abb. 23: NMR-Spektrum der Verbindung VRA 2a

muß. Dabei wird C-9 (Kopplung mit C-7[54], J = 1,8 Hz) und C-5 (s. Spektrum VRA 3) ausgeschlossen. In Frage kommt nur C-1 und C-11. Aus biogenetischen Gründen ist jedoch eine C-11-Hydroxylierung wahrscheinlicher.

Die Zusammenfassung ergibt: Bei der Verbindung VRA 2a handelt es sich um ein dem Ecdysteron isomeres Phytoecdyson. In der Seitenkette fehlt die Hydroxy-Gruppe an C-25, das Grundgerüst besitzt eine zusätzliche an C-11. Durch Vergleich mit der Literatur[54] kann mit großer Sicherheit gesagt werden, daß es sich bei VRA 2a um das bereits aus zwei verschiedenen Ajuga-Arten bekannte Ajugasteron C handelt. Obwohl alle wesentlichen Peaks in den Spektren vorhanden sind, kann eine endgültige Identifizierung der Verbindung VRA 2a nicht erbracht werden, da die Substanz nur in sehr geringer Menge und in nicht ganz reiner Form (sie ist nicht kristallisierbar und wird zur Aufnahme der Spektren gefriergetrocknet) isoliert werden kann.

2.4. Identifizierung der Verbindung VRA 2b

Die wichtigen Werte im IR liegen bei 3400 cm^{-1} (OH), 1645 cm^{-1} (C=O) und 1610 cm^{-1} (C=C). Das UV hat ein Maximum bei λ = 242 nm. Auch hier liegt wiederum die für Ecdysone charakteristische 14-OH-7-en-6-on-Gruppierung vor. Im MS fallen hauptsäch-

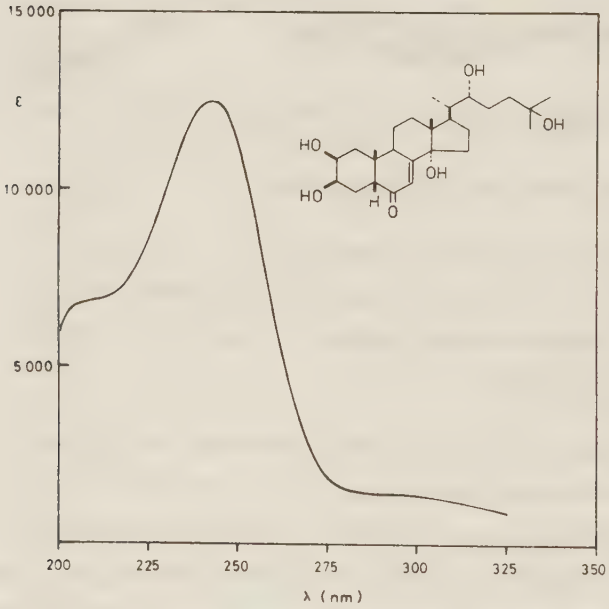


Abb. 24: UV-Spektrum der Verbindung VRA 2b

lich die sehr intensiven Ionen m/e 99 und m/e 81 auf, die durch C-20/22-Spaltung entstanden sind und auf eine gleiche Seitenkette wie in VRA 4 und VRA 3 hinweisen. Wie jedoch aus den Ionen m/e 348 und m/e 330 hervorgeht, findet die Spaltung unter gleichzeitiger Wasserstoffübertragung statt, was bei

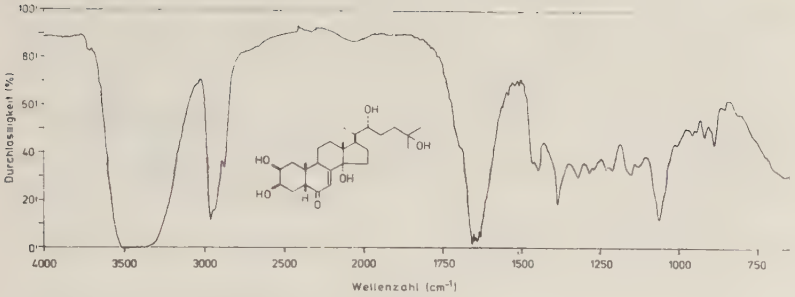


Abb. 25: IR-Spektrum der Verbindung VRA 2b

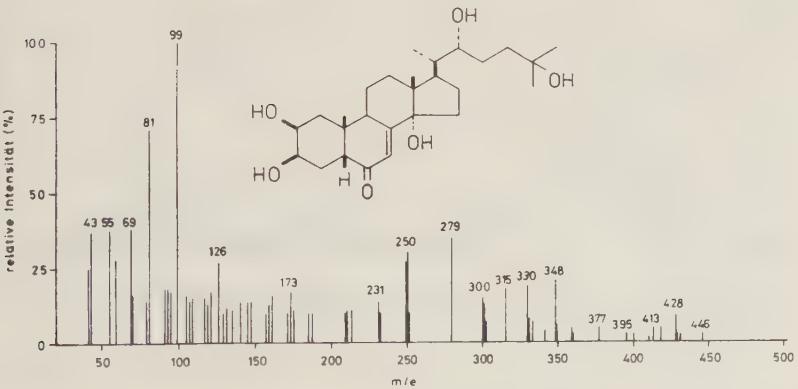


Abb. 26: Massenspektrum der Verbindung VRA 2b

fehlender C-20-OH möglich ist. Durch den M^+-18-Peak bei m/e 446 ist das Molekulargewicht von 464 gesichert. Eine dreimalige Wasserabspaltung bis m/e 410 kann verfolgt werden. Ebenso aus m/e 413, das durch CH_3-Verlust aus m/e 428 entstanden ist. Durch

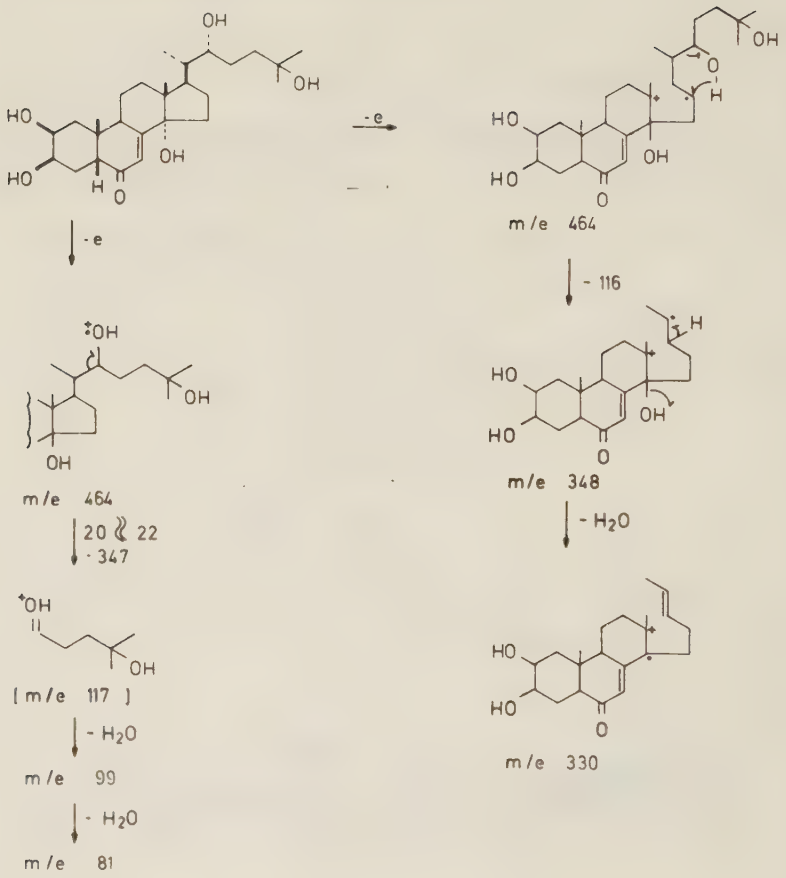


Abb. 27: Massenspektrometrischer Abbau von VRA 2b

C-17/20-Spaltung kommt es wiederum zu dem Ion m/e 300. Die gleiche Seitenkette ab C-22 und das um 16 Einheiten verringerte Molekulargewicht, in Zusammenhang mit der fehlenden C-20-Hydroxy-Gruppe, führt zu der Vermutung, daß es sich bei der Verbindung VRA 2b um das 20-Deoxyecdysteron (α-Ecdyson) handelt. Zur Bestätigung wurde mit authentischem Material ein IR- und ein Massenspektrum angefertigt. Diese Spektren waren mit denen von VRA 2b identisch.

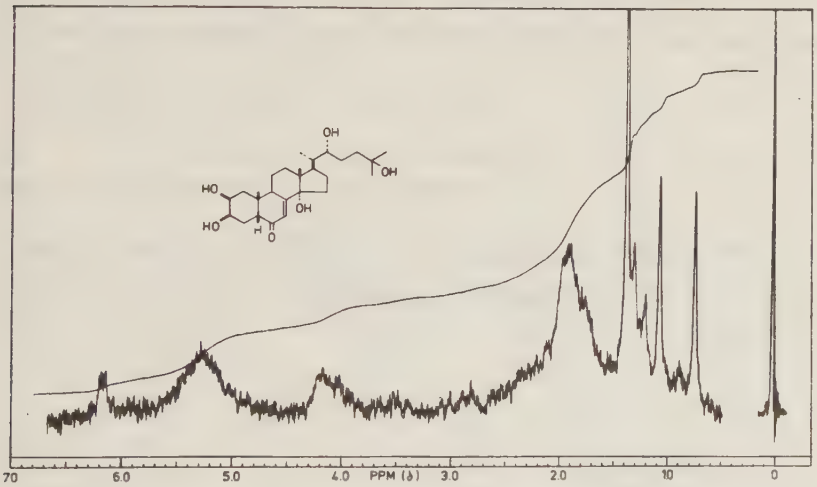


Abb. 28: NMR-Spektrum der Verbindung VRA 2b

Bei der Interpretation des NMR-Spektrums zeigt sich, wie stark der Einfluß einer 20-Hydroxy-Gruppe auf die Verschiebung von C-18-CH_3 ist. Das Signal erscheint hier bereits bei $\delta = 0{,}73$, während die Methylgruppen von C-19 und C-26/27 bei den Werten der entsprechenden Signale des Ecdysterons zu finden sind ($\delta = 1{,}09$ bzw. $\delta = 1{,}37$). Das C-21-Signal wird zu einem Dublett aufgespalten ($J = 6{,}4$ Hz). Es ist nicht mehr so stark entschirmt

und erscheint schon bei δ = 1,25. Das Dublett von C-7-H ist bei δ = 6,18.

Auch die Werte aus dem NMR-Spektrum stimmen gut mit denen in der Literatur[99)100)] für α-Ecdyson angegebenen überein. Die Identität von VRA 2b mit dieser Verbindung ist somit gesichert.

2.5. Identifizierung der Verbindung VRA 1a

Die UV- und IR-Spektren zeigen die für Ecdysone typischen Banden: IR: Breite Bande bei 3400 cm^{-1} (OH), schärfere bei 1642

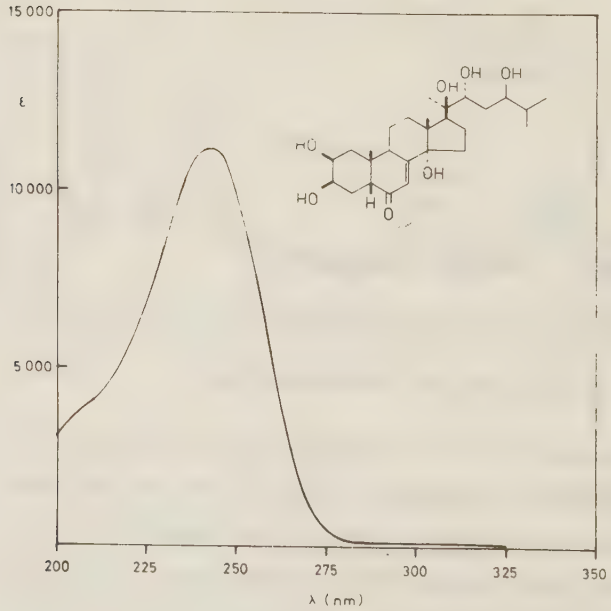


Abb. 29: UV-Spektrum der Verbindung VRA 1a

cm^{-1} (C=O) und bei 1610 cm^{-1} (C=C). UV: λ_{max} = 243 nm. Im Massenspektrum erscheint nahezu das gleiche Bild wie bei Ecdysteron. Ein M^+-Peak ist jedoch nicht vorhanden und auch der

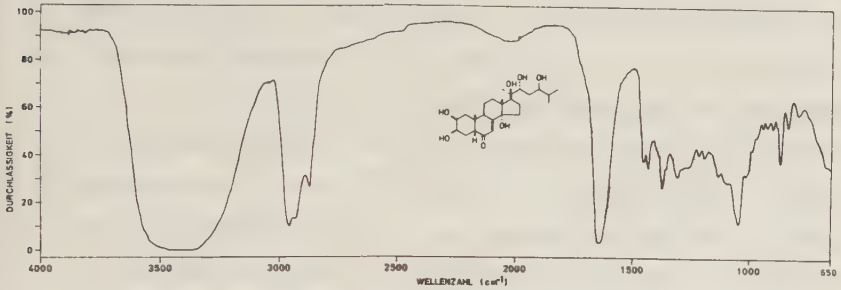


Abb. 30: IR-Spektrum der Verbindung VRA 1a

M-18 ist sehr schwach. Sehr gut ausgeprägt ist dagegen der Peak M-36 bei m/e 444. Das Ion des Grundgerüstes liegt wieder

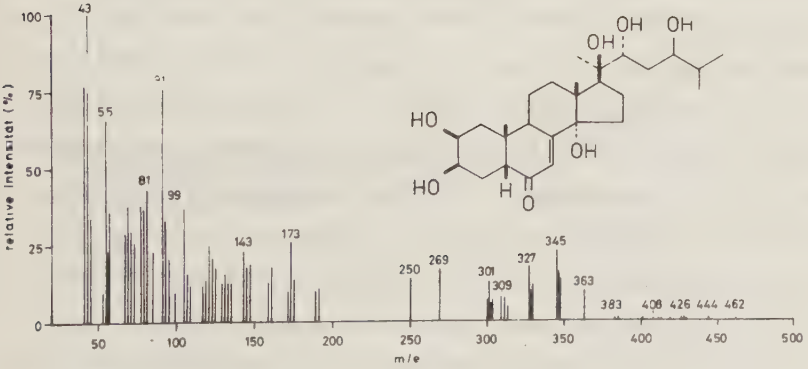


Abb. 31: Massenspektrum der Verbindung VRA 1a

bei m/e 363 und wird durch C-20/22-Spaltung hervorgerufen (ohne Wasserstoffübertragung). Auch m/e 429 ($M-2H_2O-CH_3$) ist vorhanden. Von allen drei genannten Peaks gehen deutliche Wasserabspaltungen aus. Ein auffallender Unterschied gegenüber dem Spektrum des Ecdysterons ist die sehr schwache Intensität von m/e 99 und m/e 81. Sehr wichtig zur Interpretation des Spektrums von VRA 1a erscheint mir der Peak bei m/e 419 mit zweimaligem H_2O-Verlust zum m/e 383. Er wird wahrscheinlich durch C-24/25-Fragmentierung gebildet, was bei Ecdysonen mit einer C-24-Verzweigung üblich ist. Da die Massenfragmente des Grundskeletts denen des Ecdysterons gleichen, besteht die Möglichkeit einer OH-Verschiebung von C-25 nach C-24.

Im Vergleich der NMR-Spektren von VRA 1a und VRA 4 fällt die große Ähnlichkeit mancher Methylsignale auf. Drei davon sind bei nahezu den gleichen Werten zu finden, d. h. die chemischen Verschiebungen dieser drei CH_3-Gruppen entsprechen sich. So liegt das C-21- bei $\delta = 1{,}57$, das C-18- bei $\delta = 1{,}19$ und das C-19-Signal bei $\delta = 1{,}06$. Die Integration des letzten ergibt jedoch nicht drei, sondern sechs Protonen. Wie durch das MS vermutet, hat die C-25-Hydroxy-Gruppe ihre Lage verändert. Dadurch ist erstens die Entschirmung von C-26/27-CH_3 wesentlich schwächer und zweitens werden diese Methylgruppen durch Kopplung mit H-25 zu einem Dublett ($J = 6$ Hz) aufgespalten, allerdings mit leicht verbreiterten Signalen, zu sehen in dem nicht überlagerten Teil bei $\delta = 0{,}96$. Somit liegt der Wert von CH_3-26/27 bei $\delta = 1{,}01$. Es kann mit Sicherheit angenommen werden, daß die Hydroxy-Gruppe an C-24 gebunden ist. Würde sie sich an C-23 befinden, wäre kein Einfluß mehr auf die endständigen Methyl-

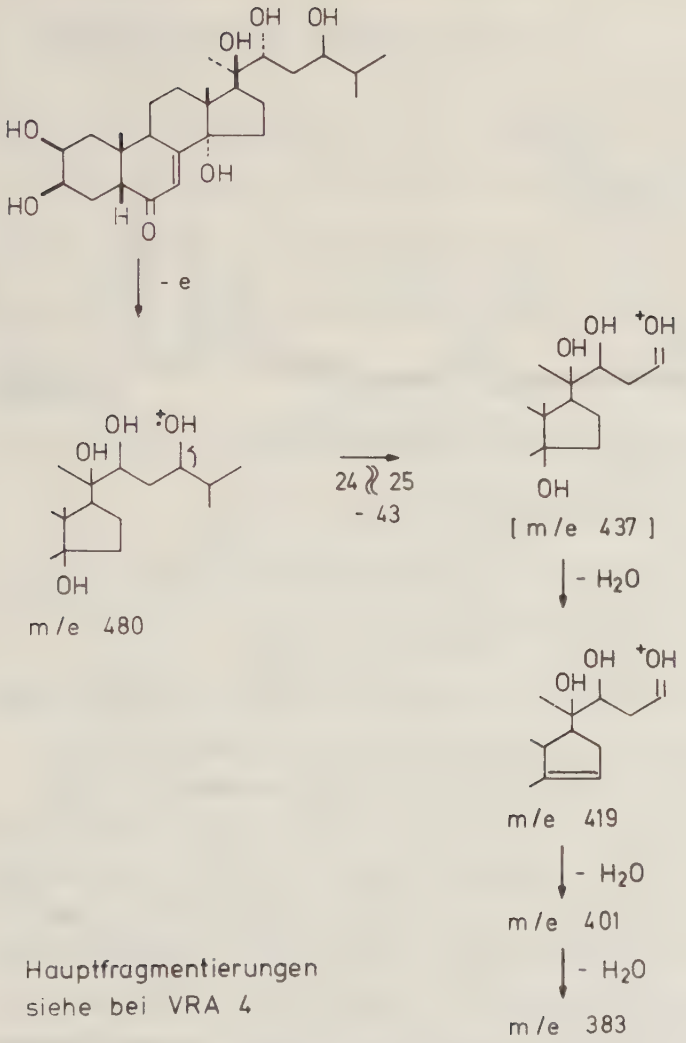


Abb. 32: Massenspektrometrischer Abbau der Verbindung VRA 1a

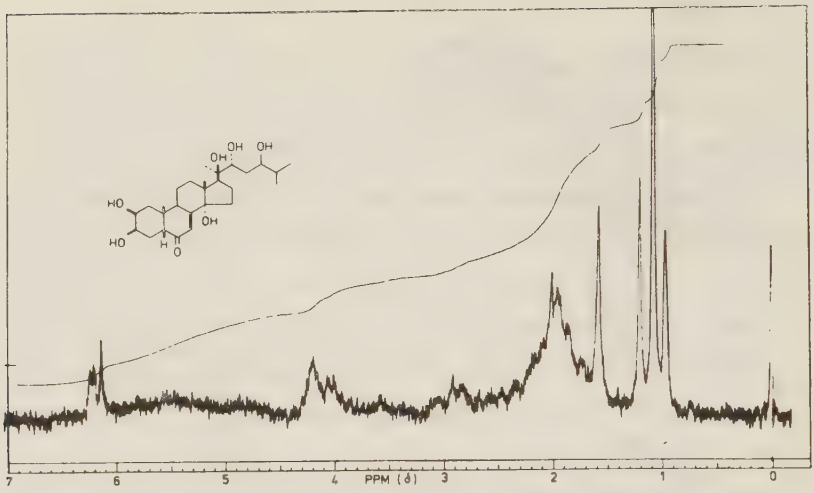


Abb. 33: NMR-Spektrum der Verbindung VRA 1a

gruppen vorhanden, sie befänden sich dann in noch höherem Feld (siehe NMR-Spektrum von VRA 2a). Die Signale im tiefen Bereich sind: $\delta = 6{,}20$ (H-7) und $\delta = 6{,}13$ (OH-14).

Die große Ähnlichkeit der Spektren von VRA 1a und VRA 4 weist auf die starke Verwandtschaft der beiden Verbindungen hin. Die Teile, die der Interpretation des Grundgerüsts dienen, sind nahezu identisch, die Unterschiede liegen lediglich in den Teilen, die der Seitenkette zugeordnet werden. Durch die Aussagen aus dem Massen- und dem NMR-Spektrum steht fest, daß sich an C-24 eine Hydroxy-Gruppe befindet, bei gleichzeitigem Fehlen der C_{25}-OH. Dies führt zu dem Ergebnis, daß es sich bei der Verbindung VRA 1a um das dem Ecdysteron isomere Pteroste-ron[95)31)] handelt, was durch Vergleich mit einem authentischen IR-Spektrum bestätigt wird.

2.6. Identifizierung der Verbindung VRA 1b

Auch bei der Verbindung VRA 1b muß es sich wieder um eine Substanz mit Ecdyson-Grundgerüst handeln. Den Hinweis erbringt das UV- und das IR-Spektrum. Die leichte, aber deutliche Verschiebung der wichtigen IR-Banden (C=O bei 1668 cm^{-1} und C=C bei 1630 cm^{-1}) läßt jedoch bereits eine Abweichung von den Verbindungen VRA 1a, 2a, 2b und 4 und eine Ähnlichkeit zu VRA 3 erkennen.

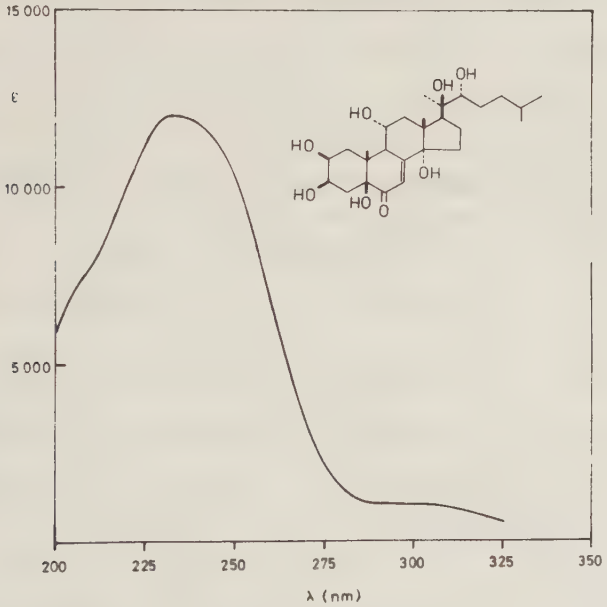


Abb. 34: UV-Spektrum der Verbindung VRA 1b

Im MS ist ein deutlicher M-18-Peak bei m/e 478 zu erkennen mit viermaliger Wasserabspaltung zu m/e 406. Eine zweite Reihe ist von m/e 445 ($M-2H_2O-CH_3$) zu verfolgen bis m/e 391. Durch

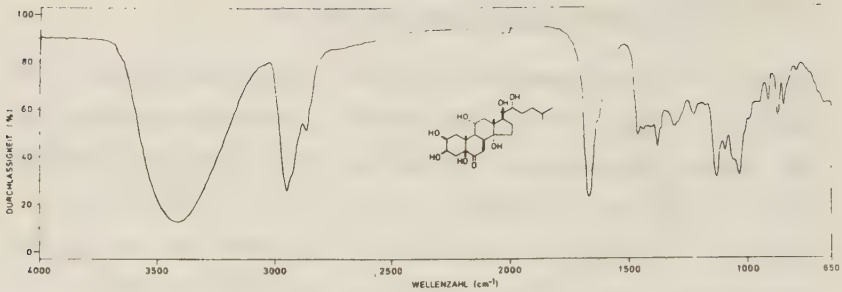


Abb. 35: IR-Spektrum der Verbindung VRA 1b

Abspaltung der Seitenkette an C-20 entsteht das Ion m/e 395, das durch fortlaufenden Verlust von 18 Einheiten bis m/e 305 ergänzt wird.Das kann nur bedeuten,daß am Grundgerüst von VRA 1b zwei gegenüber Ecdysteron (das m/e 395 entsprechende Ion ist

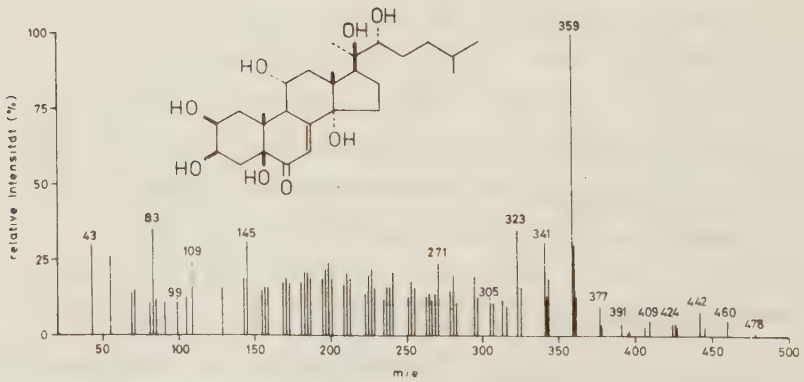


Abb. 36: Massenspektrum der Verbindung VRA 1 b

m/e 363) zusätzliche Sauerstoff-Funktionen zu finden sind. Das korrespondierende, durch C-20/22-Spaltung entstandene, Ion der Seitenkette ist bei m/e 83 (M^+-395-18-18) zu finden, während die sonst dominierenden Peaks bei m/e 99 und 81 fehlen. Diese um 16 Einheiten reduzierte Seitenkette läßt, bei gleichzeitiger Fragmentierung zu Bruchstücken mit ungeraden Massenzahlen, eine Parallele zu VRA 2a erkennen. Auch die durch C-17/20-Spaltung gebildeten Peaks bei m/e 145 und m/e 109 sind vorhanden. Somit kann bis hierher gesagt werden, daß die Verbindung VRA 1b ein Isomeres von Polypodin B darstellt, jedoch mit einer in der Seitenkette fehlenden, zusätzlich im Grundgerüst vorhandenen Sauerstoff-Funktion.

Im NMR fällt das dublettartige Signal bei sehr hohem Feld (δ = 0,83) auf, dessen Integration sechs Protonen ergibt. Es muß den beiden endständigen Methylgruppen zugeteilt werden, wodurch das Fehlen einer OH-25 gesichert ist. Die CH_3-Gruppe an C-20 ist gegenüber VRA 4 nicht verändert (δ = 1,53). Auch das C-18-CH_3 zeigt eine nur geringfügig stärkere Verschiebung nach tieferem Feld (δ = 1,23). Bei einem Vergleich mit den bisher besprochenen NMR-Spektren der Ecdysone ist eine deutliche Parallelität in der chemischen Verschiebung der Methylsignale von VRA 1b und Ajugasteron C (VRA 2a) zu erkennen. Eine Abweichung von 0,08 ppm nach tieferem Feld ist jedoch für das C-19-CH_3 festzustellen. Diese Methylgruppe wird stark durch die beiden, aus dem MS ermittelten, zusätzlichen Hydroxy-Gruppen beeinflußt. Eine davon befindet sich an C-5, wie aus dem Signal bei δ = 6,66 ersichtlich ist. Da durch deutliche Kopplung zu H-7 (δ = 6,23) und Aufspaltung zu einem Dublett (J = 2,6 Hz) das H-9 bestätigt ist, kann mit großer Wahrscheinlich-

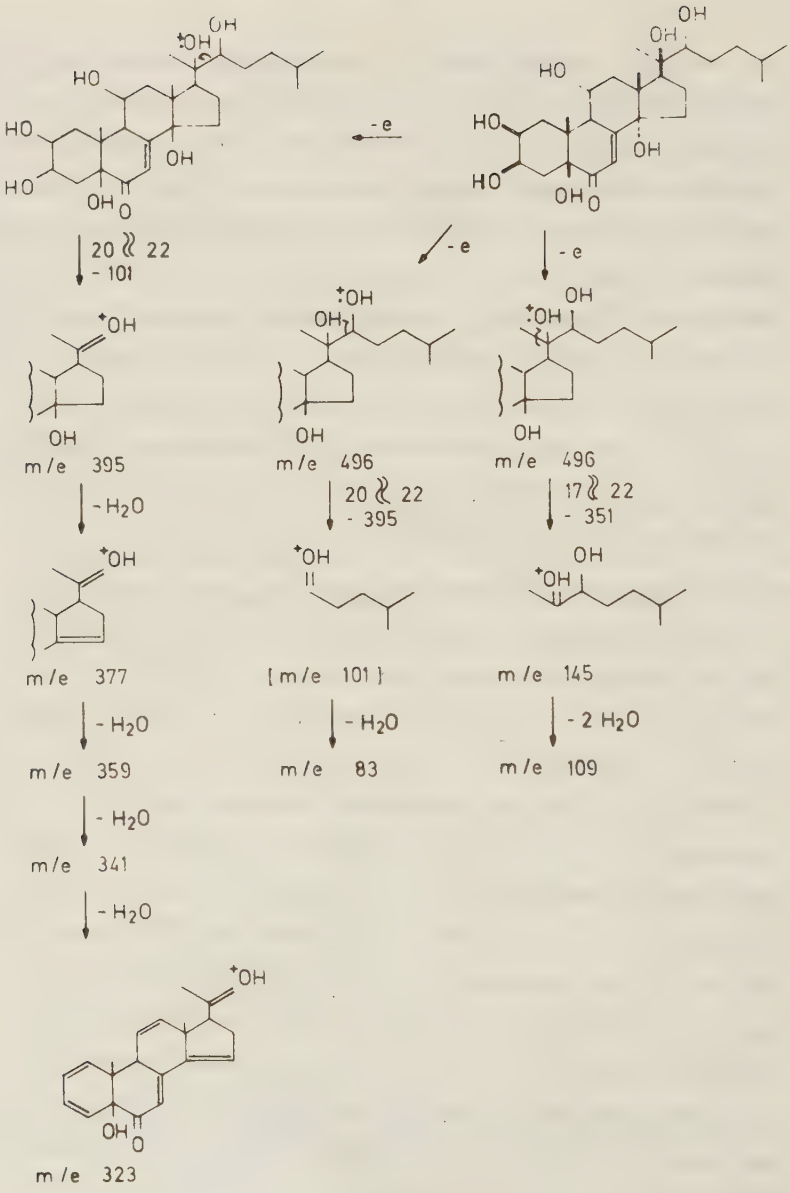


Abb. 37: Massenspektrometrischer Abbau der Verbindung VRA 1b

keit angenommen werden, daß analog zu VRA 2a eine 11-Hydroxylierung stattgefunden hat. Werden die entsprechenden Inkremente der 5-OH- und 11-OH-Verbindungen (VRA 3 bzw. VRA 2a) addiert (bezogen auf Ecdysteron), so erhält man einen Wert (1,06 + 0,03 + 0,24 = 1,33), der nur geringfügig von dem gemessenen von δ = 1,38 abweicht.

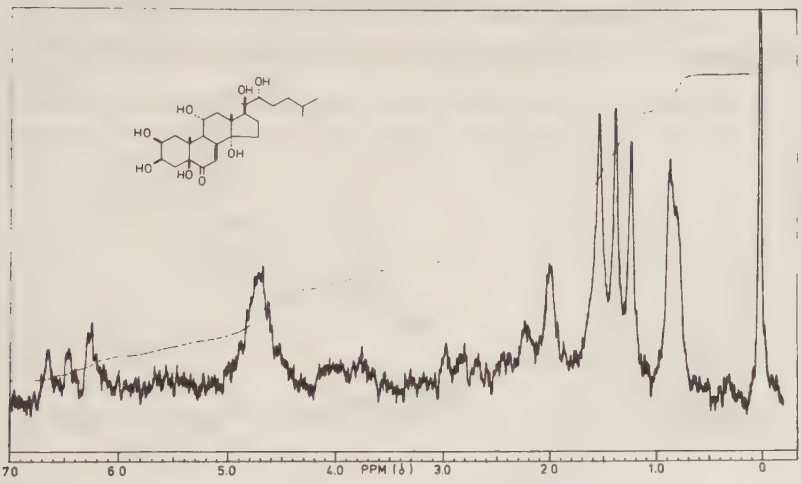


Abb. 38: NMR-Spektrum der Verbindung VRA 1b

Zur Bestätigung und Erweiterung der bis hierher gewonnenen Daten wird die Verbindung in ein Diacetonid-Acetat überführt. Dazu wird sie in Aceton gelöst und mit acetonischer Phosphorsäuremolybdän-Lösung versetzt[92]. Die Acetylierung erfolgt unter den üblichen Bedingungen mit Pyridin/Essigsäureanhydrid (1:1) und einer Reaktionszeit von 24 Stunden.

Das Massenspektrum des Reaktionsproduktes kann in drei Bereiche eingeteilt werden. Der obere ist geprägt durch die Ionen m/e

603 (M^+-15), m/e 558 (M^+-60), m/e 543 (M^+-60-15), m/e 540 (M^+-60-18) und m/e 525 (M^+-60-15-18). Es folgen, hauptsächlich von m/e 540 und m/e 525 aus, ein- und zweifache Abspaltungen von Aceton und parallel dazu, bereits in den mittleren Bereich übergehend, Fragmentierungen durch C-17/20- und C-20/22-Spaltung. Als erstes tritt das Ion mit m/e 367 auf, das aus m/e 467 (525 - 58) durch C-20/22-Spaltung erklärt werden kann, gefolgt von m/e 355, durch Verlust der vollständigen Seitenkette

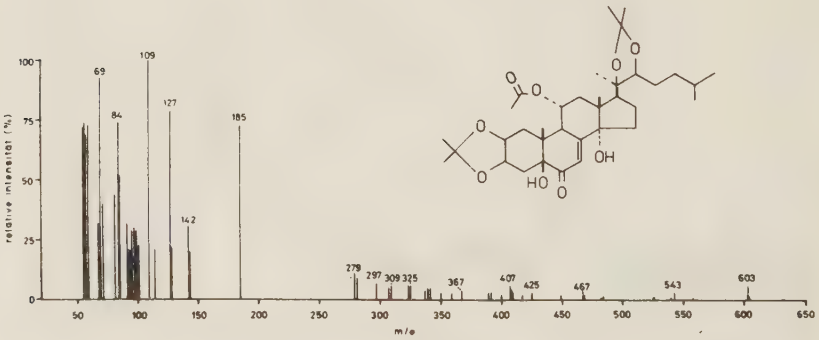


Abb. 39: Massenspektrum der Verbindung VRA 1b-Diacetonid-Acetat

aus m/e 540. In diesem Fall ist die Aceton-Abspaltung zum Peak m/e 297 nach der Seitenkettenabtrennung erfolgt. Die einzelnen Peaks werden häufig von Wasser- oder Methylabspaltungen begleitet. Im unteren Bereich des Spektrums sind die intensivsten Peaks zu finden. Es sind folgende Seitenkettenfragmente entstanden: m/e 185, m/e 127, m/e 109 (durch C-17/20-Spaltung) und m/e 142, m/e 84, m/e 69 (durch C-20/22-Spaltung).

Durch das MS können folgende Aussagen gemacht werden: Es be-

finden sich zwei α-Glykol-Gruppierungen im Molekül (Bildung eines Diacetonids), eine weitere Hydroxy-Gruppe konnte acetyliert werden. Durch den M-15-Peak wurde das Molekulargewicht der Verbindung VRA 1b von 496 bestätigt. Die Seitenkette hat außer an C-20 und C-22 keine weiteren Sauerstoff-Funktionen.

Im NMR-Spektrum sind die gegenüber der Ausgangsverbindung neu hinzugekommenen Methylsignale der Acetonidgruppierungen im Bereich von $\delta = 1{,}2$ bis $\delta = 1{,}7$ vorhanden, sowie der Acetat-Peak bei $\delta = 2{,}17$. Das C-26/27-Dublett tritt bei der gleichen

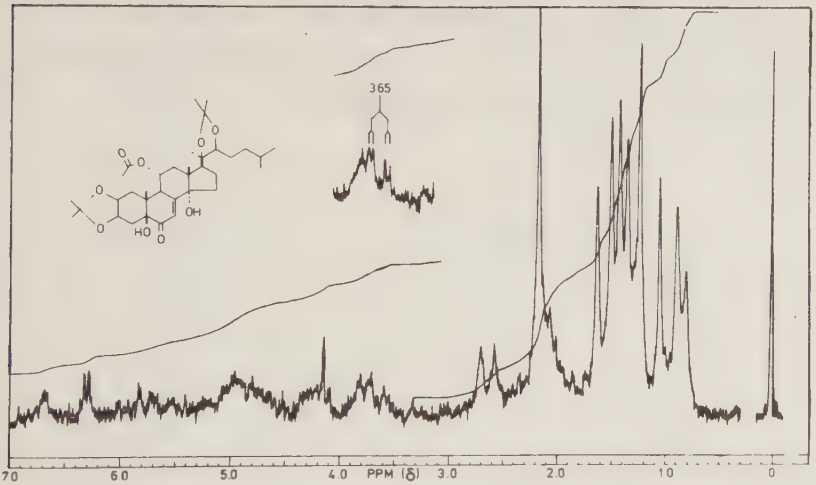


Abb. 40: NMR-Spektrum der Verbindung VRA 1b-Diacetonid-Acetat

Verschiebung auf, ebenso das OH-5. Als wesentliche Erweiterung gegenüber der Ausgangsverbindung muß das Doppeldublett bei $\delta = 3{,}65$ angesehen werden mit den Kopplungskonstanten $J = 9$ Hz und 2,5 Hz. Für die Zuordnung kommt nur das C-9-H in Frage, das mit H-7 allylisch koppelt. Für die zweite Aufspaltung ist das C-11-βH verantwortlich, da die große Kopplungskonstante von 9 Hz nur durch eine diaxiale Anordnung der vicinalen Protonen

erklärbar ist. Da eine weitere Aufspaltung von H-9 nicht stattgefunden hat, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß es sich bei der Verbindung VRA 1b um ein 11α-Hydroxyecdyson handelt. Als weiterer Beweis kann die leichte Acetylierbarkeit angesehen werden, was nur bei äquatorialer Anordnung der 11-Hydroxy-Gruppe der Fall ist, eine axiale dagegen ist sterisch stark behindert. CANONICA und Mitarb.[96] haben 1972 aus den Samen einer Ipomoea-Art ein 5ß,11α-dihydroxy-25-deoxy-ecdysteron isoliert, das sie Muristeron A nannten. Die Literaturdaten entsprachen denen für VRA 1b gefundenen. Durch direkten Vergleich von DC und IR-Spektren konnte die Identität der beiden Verbindungen bestätigt werden[+].

+) Ich danke Herrn Professor L. Canonica für die Überlassung einer authentischen Probe von Muristeron A.

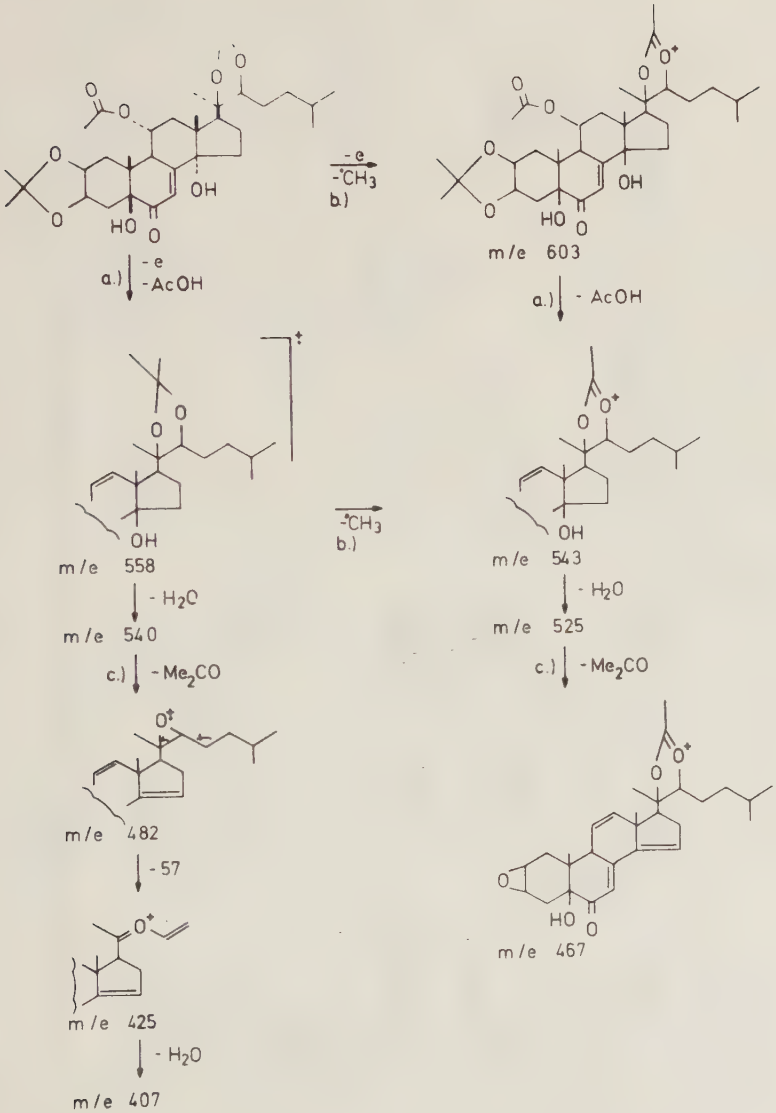


Abb. 41: Massenspektrometrischer Abbau der Verbindung VRA 1b-Diacetonid-Acetat

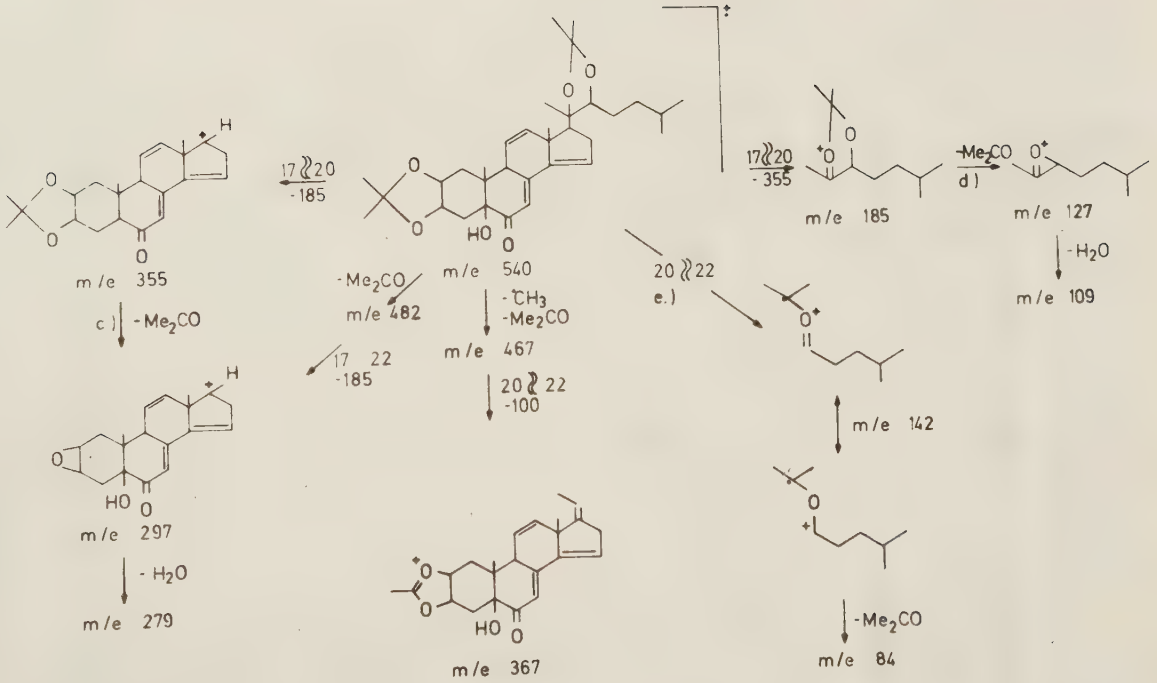


Abb. 42: Fragmentierungsschema durch C-17/20- und C-20/22-Spaltung

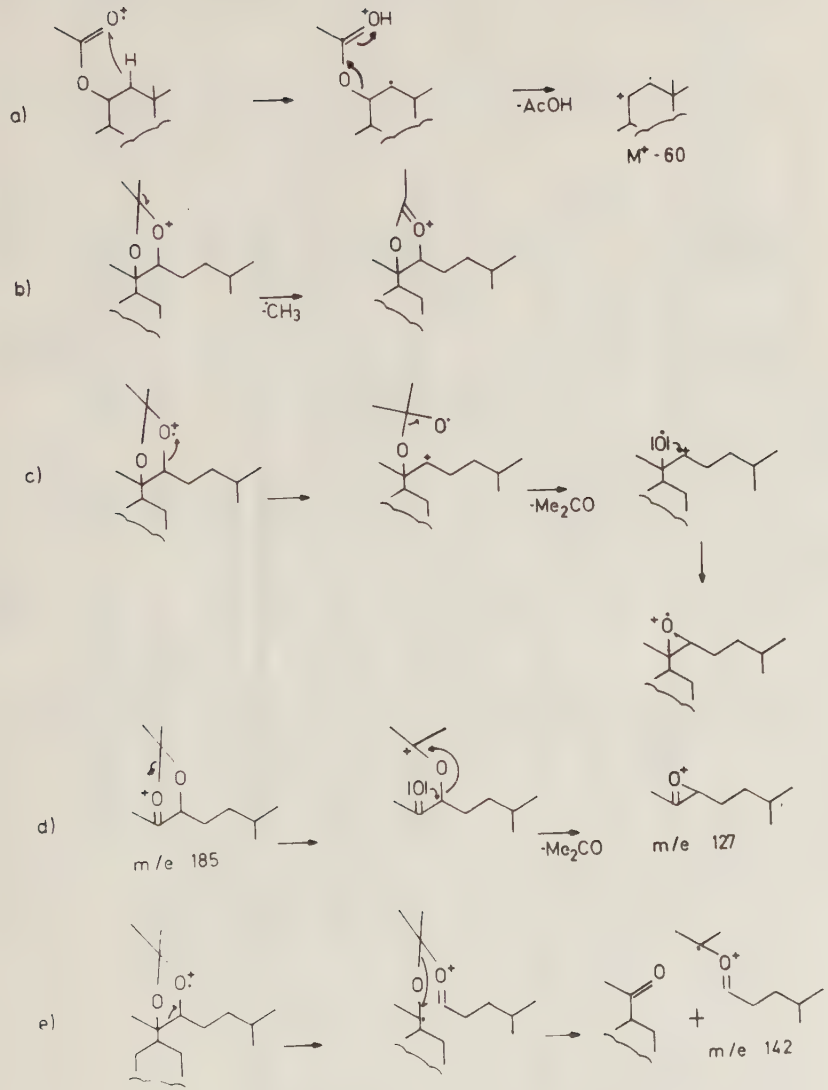


Abb. 42 a:

	CH_3-18	CH_3-19	CH_3-21	CH_3-26/27	CH-7	C-14-OH
VRA 1a	1,19(0,98)	1,06(1,08)	1,57(1,55)	1,01(1,03) d: 6 Hz	6,21(6,20)	6,14
VRA 1b	1,23(1,16)	1,38(1,30)	1,53(1,56)	0,83(0,84) d: 3,5 Hz	6,23(6,21)	6,47
VRA 2a	1,24(1,13)	1,30(1,18)	1,53(1,50)	0,85(0,84 d: 4 Hz	6,28(6,22)	6,28
VRA 2b	0,73(0,66)	1,09(0,95)	1,25(1,18) d: 6,4 Hz	1,37(1,37)	6,18(6,12)	6,18
VRA 3	1,15(1,03)	1,09(1,06)	1,52(1,52)	1,35(1,38)	6,20(6,13)	6,18
VRA 4	1,18(0,94)	1,06(1,04)	1,55(1,52)	1,36(1,38)	6,16(6,16)	6,00

Tabelle 7: Chemische Verschiebung der Methylsignale sowie H-7 und OH-14 (Werte in Klammern nach Austausch mit D_2O)

	Molekülfragmente	C-20/22-Spaltung		C-17/20-Spaltung	
		Grundkörper	Seitenk.	Grundk.	Seitenk.
VRA 1a	462(0,1) 429(0,5) 444 (1) 411(0,5) 426 (1) 408(0,5) 419 (0,5) 401 (1) 383 (1)	363 (10) 345 (23) 327 (18) 309 (8)	99 (10) 81 (43) 43(100)	301 (13) 300 (7)	143 (23)
VRA 1b	478 (1) 445 (3) 460 (5) 427 (3) 442 (8) 409 (5) 424 (4) 391 (4) 406 (3)	377 (10) 359(100) 341 (31) 323 (35) 305 (11)	83 (35)		145 (31) 109 (23)
VRA 2a	462 (1) 429 (2) 444 (3) 411 (2) 426 (4) 393 (2) 408 (2)	379 (8) 361 (23) 343 (67) 325 (58) 307 (14)	83 (29) 43 (100)		145 (26) 109 (30)
VRA 2b	446 (3) 413 (5) 428 (9) 395 (3) 410 (2) 377 (5) 359 (5)	348 (21) 330 (19) 315 (18)	99 (100) 81 (71)	300 (15)	126 (27)
VRA 3	478 (1) 427 (5) 460 (2) 409 (6) 442 (13) 391 (3) 424 (7) 406 (3)	379 (28) 361 (54) 343 (30) 325 (36) 307 (11)	99 (72) 81 (60) 43 (100)	316 (24)	143 (40)
VRA 4	480 (1) 429 (12) 462 (1) 411 (8) 444 (4) 393 (5) 426 (26) 375 (4) 408 (9)	363 (88) 346 (84) 345 (88) 327 (83) 309 (22)	99 (100) 81 (90)	301 (30) 300 (37) 285 (30) 269 (39)	143 (59)

Tabelle 8: Übersicht der wichtigsten Massenfragmente

2.7. Identifizierung der Verbindung VRA 5

Da es schon verschiedentlich gelungen ist, Iridoide vom Aucubin-Typ in Vitex-Arten nachzuweisen, liegt es nahe, zunächst zu untersuchen, ob es sich bei VRA 5 um eine Verbindung dieser Stoffklasse handelt. Es wird bestätigt, da im IR-Spektrum die typische Enoläther-Bande bei 1650 cm^{-1} vorhanden ist. Da im IR von VRA 5 auch Aromaten-Banden (z. B. bei 853 und 838 cm^{-1}) zu finden sind, besteht die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei dieser Verbindung um das aus Vitex-Arten bekannt gewordene Iridoid Agnusid handelt. Die DC-Prüfung in drei verschiedenen Systemen mit authentischem Agnusid und der Vergleich der IR-Spektren bestätigt die Identität der beiden Verbindungen.

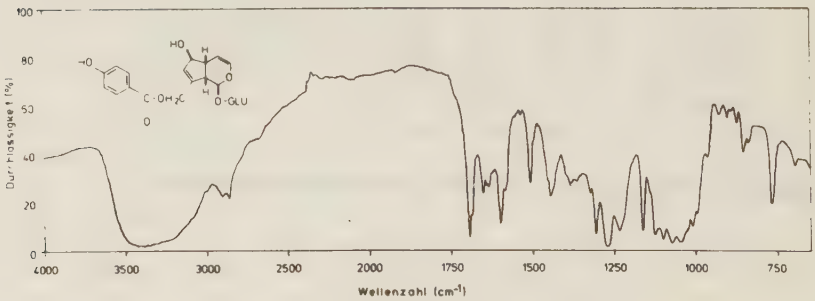


Abb. 44: IR-Spektrum der Verbindung VRA 5

2.8. Identifizierung der Verbindung VRA 8

In analoger Weise wie bei VRA 5 wird auch bei der Identifizierung der Verbindung VRA 8 vorgegangen. Das IR-Spektrum weist eine intensive Bande bei 1642 cm^{-1} auf, es fehlen jedoch die in VRA 5 vorhandenen Aromaten-Banden. So besteht die Möglichkeit, daß es sich bei VRA 8 um das in mehreren Vitex-Arten nachgewiesene Aucubin handelt. Ein Vergleich mit authentischem Material (DC in drei verschiedenen Systemen, IR) bestätigt die Identität.

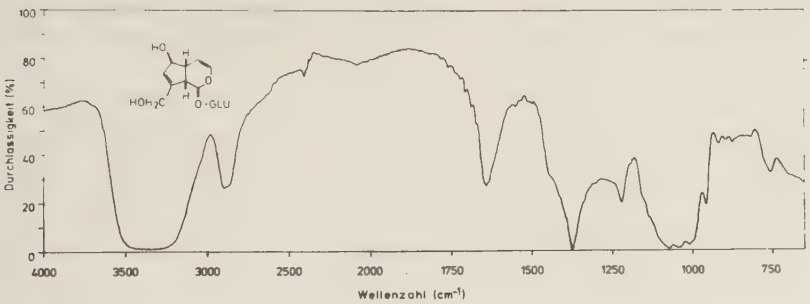


Abb. 45: IR-Spektrum der Verbindung VRA 8

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

EXPERIMENTELLER TEIL

IV. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

1. Allgemeine Angaben

1.1. Herkunft der Droge

Das zu untersuchende Material wurde Anfang 1970 in der Gegend von Yangambi (Zaire) gesammelt. Ein Herbarexemplar der Pflanze wird im Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der FU Berlin aufbewahrt.
Das Drogenmaterial bestand aus Blättern und Stengelteilen.

1.2. Chromatographie

Zur Dünnschichtchromatographie wurden Platten von 20 x 20 cm Größe verwendet. Für die laufenden Untersuchungen gelten Standardbedingungen nach STAHL[101], die Schichtdicke des Sorptionsmittels (Kieselgel F "Woelm" DC) betrug etwa 0,25 mm. Die in der vorliegenden Arbeit angegebenen Rf-Werte (hRf = Rf x 100) gelten für DC-Fertigplatten Kieselgel F_{254} "Merck", die eine bessere Reproduzierbarkeit der Werte gewährleisten.
Detektion: Als Sprühreagenz wurde eine Lösung von 3 % Vanillin in Aethanol und 1 % konz. H_2SO_4 verwendet. Optimale Farbausbildung ergab sich nach 2-3minütigem Erhitzen im Trockenschrank bei 120° C.
Zur präparativen Schichtchromatographie wurden Platten von 20 x 40 cm Größe verwendet. Die Schichtdicke des Sorptionsmittels (Kieselgel F "Woelm" DC) betrug etwa 0,5 mm. Zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel "Woelm" mit einer Korn-

größe von 0,05 - 0,2 mm, Aluminiumoxid W 200 neutral (Woelm) und Celite 545 verwendet.
Für die Gelfiltration wurde Sephadex G25 und G15 verwendet.
Konzentrationsangaben bei Fließmitteln beziehen sich auf Volumina (v/v).

1.3. Spektroskopie

UV-Spektroskopie: Die Absorptionsspektren wurden mit einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ 2 aufgenommen. Schichtdicke der Quarzküvette: 1 cm, Lösungsmittel: Methanol (Uvasol).

IR-Spektroskopie: Die IR-Spektren wurden mit einem Leitz-Unicam-Spektralphotometer SP 200 G aufgenommen. Zur Messung gelangten KBr-Preßlinge.

NMR-Spektroskopie: Die Kernresonanzspektren wurden mit einem Spektrometer Varian-S-60 aufgenommen. Lösungsmittel: Pyridin-d_5, Tetramethylsilan als innerer Standard. Alle Angaben von ppm sind δ-Werte.

Massenspektroskopie: Die Massenspektren wurden mit einem Massenspektrographen CH 7 Varian MAT Bremen aufgenommen.

1.4. Schmelzpunktbestimmung - Gefriertrocknung

Schmelzpunktbestimmung: Die Schmelzpunkte wurden mit einem KOFLER-Heiztischmikroskop bestimmt.

Gefriertrocknung: Die Gefriertrocknung erfolgte mit der Leybold-Heraeus-Anlage Gt 2.
Lösungsmittel: Wasser.

2. Spezielle Angaben

2.1. Isolierung

2.1.1. Extraktion der Droge und säulenchromatographische Abtrennung des hydrophilen Teiles

Die Droge wird in Blätter (Anteil F) und Stengelteile (Anteil sF) getrennt und parallel wie folgt verarbeitet. Je 250 g Anteil F und Anteil sF (Aufarbeitung insgesamt: 2400 g Droge) werden zerkleinert und unter Rückfluß zunächst mit Aethanol (96 %ig, 1 l), dann zweimal mit Aethanol-Wasser (80 %ig, je 0,8 l) jeweils 30 Minuten lang extrahiert. Die gesammelten Auszüge ergeben nach dem Abpressen, Filtrieren und Einengen i.V. 51,2 g (sF = 20,3 g und F = 30,9 g) Rohextrakt, der, an Celite (sF = 30 g, F = 50 g) gebunden, so lange getrocknet wird, bis ein streufähiges Pulver entsteht. Zur weitgehenden Abtrennung der lipopohilen Bestandteile wird dieses über einer Celite-Säule (sF = 50 g, F = 70 g) bis zur sehr schwachen Grünfärbung mit Hexan/Methylenchlorid (1:1) eluiert. Der lipophile Extrakt (sF = 2,56 g, F = 6,14 g) wird nicht weiter aufgearbeitet. Es folgt die Elution der mehr hydrophilen Bestandteile mit Methylenchlorid/Methanol (1:1). Verbrauch: sF = 2 l, F = 2,6 l. Nach dem Einengen ergeben sich 25,6 g (sF = 10,9 g, F = 14,7 g) Extrakt, der, wiederum an Celite gebunden und getrocknet, zur weiteren Reinigung auf eine Säule mit neutralem Aluminiumoxid (100 g) gegeben wird. Die Elution mit Wasser erfolgt so lange (jeweils etwa 2,5 l), bis die abtropfende Lösung nur noch sehr schwach gelb ist und keine UV-Aktivität bei 254 nm mehr zeigt. Das Eluat wird eingeengt und getrocknet. Es resultiert ein hellgelber, schaumiger Extrakt (sF = 7,5 g, F = 11,1 g).

2.1.2. Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Extrakte aus Anteil sF und Anteil F

Zur chromatographischen Untersuchung werden die beiden Extrakte in Methanol (sF = 30 ml, F = 44,4 ml) gelöst und hiervon je 0,15 ml aufgetragen. Als Fließmittel dient das Gemisch Methylenchlorid/Methanol/Wasser im Verhältnis 75 : 25 : 2,5 (Fließmittel A 1). Die Auswertung der entwickelten Platten erfolgt durch Nachweis der UV-Aktivität und durch Besprühen mit Vanillinreagenz und anschließendem Erhitzen auf 120° C. Es können die Substanzen

VRA 1 (hRf 60,5; bläulichgrün)
VRA 2 (hRf 56,0; blaugrün)
VRA 3 (hRf 53,0; grün)
VRA 4 (hRf 48,6; grün)
VRA 5 (hRf 40,6; lila)
VRA 6 (hRf 34,7; gelb)
VRA 7 (hRf 28,0; gelb)
VRA 8 (hRf 20,0; violett)
VRA 9 (hRf 12,7; hellbraun) und
VRA 10 (hRf 6,7; braun)

sichtbar gemacht werden.
Die Substanzen VRA 1 - VRA 5 zeigen UV-Aktivität. Die Auswertung ergibt, daß sich die Spektren der Anteile sF und F weitgehend gleichen, lediglich die Intensität der Verbindung VRA 8 ist bei sF schwächer. Die Extrakte werden zur weiteren Aufarbeitung vereinigt.

2.1.3. Isolierung der Verbindungen VRA 1 bis VRA 10

Die Auftrennung der vereinigten Extrakte erfolgt durch Säulenchromatographie an Kieselgel. Die dazu verwendete Celite-Verreibung (Gesamtextrakt - 18,6 g - in wenig MeOH aufnehmen, mit 20 g Celite verreiben, trocknen) wird auf eine mit Kieselgel (600 g) beschickte Säule (Ø 5,5 cm) mit einer Schichthöhe von 67 cm gegeben. Eluiert wird mit dem Fließmittelgemisch Methylenchlorid/Methanol/Wasser und zwar zunächst im Verhältnis 80 : 20 : 2 (Fließmittel A 2) (ca. 3000 ml), daran anschließend 70 : 30 : 3 (ca. 1000 ml). Die Tropfgeschwindigkeit wird so eingestellt, daß 20 ml/5 Min. fraktioniert aufgefangen werden können. Nach DC-Prüfung einheitliche Fraktionen werden vereinigt und eingeengt. Es resultieren die Fraktionen 1 bis 4:

Fraktion	Abdampfrückstand (g)	DC-Prüfung (75:25:2,5)
1	4,25	VRA 1 - 4
2	1,97	VRA 4 - 7
3	1,60	VRA 7 - 10
4	4,70	VRA 9 - 10

Die Verbindungen VRA 6 und 7, sowie 9 und 10 bleiben im Rahmen dieser Arbeit unberücksichtigt. Die restlichen werden durch wiederholte Säulenchromatographie isoliert und identifiziert.

2.1.3.1. Isolierung von Ecdysteron (VRA 4) und Polypodin B (VRA 3) sowie der Substanzgemische VRA 2 und VRA 1

4,25 g Extrakt der Fraktion 1, die die Ecdysone VRA 1 - VRA 4 enthält, werden als Celite-(5 g)-Verreibung auf eine Kieselgelsäule (450 g, Ø 4,5 cm, Schichthöhe 60 cm) gegeben und mit ca. 2 l Fließmittel A2 eluiert (Tropfgeschwindigkeit 2 ml/Min.). Aufgefangen werden Fraktionen mit 20 ml. Nach DC-Prüfung resultieren 5 Teilfraktionen. Fraktion 1.1 enthält VRA 1 und 1.5 VRA 4. Dazwischen liegen drei Mischfraktionen: 1.2 mit VRA 1/2/3, 1.3 mit VRA 2/3 und 1.4 mit VRA 2/3/4. Die einzelnen Fraktionen werden gesammelt und i. V. eingeengt. 1.2 bzw. 1.4 werden jeweils erneut an Kieselgel unter den entsprechenden Bedingungen wie oben angegeben aufgetrennt. Der Trennungsvorgang wird mehrmals wiederholt und führt zu einer Anreicherung der Fraktion 1.3. Es gelingt jedoch in diesem System nicht,aus 1.2 VRA 1 bzw. aus 1.4 VRA 4 völlig abzutrennen.

Die Restfraktion 1.2 wird durch Gelfiltration an einer Sephadex (G 25)-Säule (Schichthöhe 65 cm, Ø 3 cm) mit Wasser als Elutionsmittel weiter aufgetrennt. Es werden jeweils 2 ml fraktioniert aufgefangen. Auf diese Weise ist es möglich, im Vorlauf (4 Gläser ≙ 8 ml) die Verbindung VRA 3 in reiner Form zu erhalten, während der Nachlauf die Substanzgemische VRA 1 und VRA 2 (Fraktion 1.2.1) enthält. Durch wiederholtes Aufbringen der Mischfraktion auf Sephadex wird VRA 3 einerseits und Fraktion 1.2.1 andererseits angereichert. Entsprechend wird mit den Fraktionen 1.3 (im Vorlauf VRA 3, im Nachlauf VRA 2) und 1.4 (im Vorlauf VRA 3 und VRA 4:Fraktion 1.4.1, im Nachlauf

VRA 2) verfahren. Die erhaltenen Fraktionen 1.2.1 und 1.4.1 können anschließend an Kieselgel im oben beschriebenen System unter entsprechenden Bedingungen in die Einzelkomponenten aufgetrennt werden.
Die Verbindungen VRA 3 und VRA 4 werden aus Aceton umkristallisiert, die Substanzgemische VRA 2 nach 2.1.3.2. und VRA 1 nach 2.1.3.3. weiter aufgearbeitet.

2.1.3.2. Isolierung von Ajugasteron C (VRA 2a) und α-Ecdyson (VRA 2b)

60 mg VRA 2 werden als Celite-Verreibung (siehe oben) auf eine mit Kieselgel (60 g, aufgeschlemmt in Butanol/Toluol/Wasser 2 : 1 : 3 - Oberphase - und fünfmal mit frischer Oberphase gewaschen) beschickte Säule (Ø 2 cm) gegeben und mit der Oberphase dieses Fließmittels eluiert. Die Tropfgeschwindigkeit beträgt 1 ml/Min., aufgefangen werden Fraktionen mit 10 ml. Nach DC-Prüfung kann jeweils ein Teil VRA 2a und VRA 2b rein erhalten werden. Die Mischfraktion wird eingeengt und wie oben beschrieben wiederum auf die Säule gegeben. Nach viermaliger Wiederholung dieses Trennungsvorgangs werden die entsprechenden Fraktionen vereinigt, über einer Sephadex-Säule (G 25) gereinigt und aus wässriger Lösung gefriergetrocknet. Es resultieren 22 mg Ajugasteron C und 24 mg α-Ecdyson als weißes Pulver.

2.1.3.3. Isolierung von Pterosteron(VRA 1a) und Muristeron A (VRA 1b)

280 mg VRA 1 (aus mehreren Ansätzen gesammelt, entsprechend etwa 100 mg aus 500 g Droge) werden, in methanolischer Lösung, zur präparativen DC-Trennung auf 10 Platten (Schichtdicke 0,5 mm, Kieselgel F Woelm DC) aufgebracht. Nach dreimaligem Entwickeln in Aceton/Toluol (4:1) können die getrennten Zonen entnommen werden. Das Kieselgel wird fünfmal mit 10 ml Methanol eluiert und die gesammelten Eluate eingeengt. Es resultieren 225 mg Pterosteron und 23 mg Muristeron A.

2.1.3.4. Isolierung von Agnusid (VRA 5)

Die Fraktion 2 aus der in Abschnitt 2.1.3. dargestellten Grobauftrennung des Gesamtextraktes enthält neben Ecdysteron (VRA 4) und den nicht identifizierten Verbindungen VRA 6 und 7 hauptsächlich Agnusid (VRA 5). Zur Auftrennung wird der Abdampfrückstand (1,97 g), an Celite (4 g) gebunden, auf eine mit Kieselgel (160 g) beschickte Säule (Ø 2,5 cm) gegeben und mit Methylenchlorid/Methanol/Wasser (80:20:2) eluiert. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1,5 ml/Min. werden Fraktionen mit 10 ml aufgefangen. Im Vorlauf kann Ecdysteron nahezu vollständig abgetrennt werden, ebenso im Nachlauf die Verbindung VRA 7. Die Abtrennung von VRA 6 erfordert jedoch noch zwei weitere säulenchromatographische Trennungsschritte in dem oben beschriebenen System. Die VRA 5 enthaltenden Fraktionen (DC-Prüfung) werden vereinigt und durch Gelfiltration (Sephadex G 15) gereinigt. Die Substanz wird aus wässriger Lösung gefriergetrocknet. Es resultieren 85 mg Agnusid als weißes Pulver.

2.1.3.5. Isolierung von Aucubin (VRA 8)

Aucubin (VRA 8) wird aus der Fraktion 3 (siehe Abschnitt 2.1.3.), die zusätzlich noch die nicht identifizierten Verbindungen VRA 7, 9 und 10 enthält, säulenchromatographisch, wie bei Agnusid (2.1.3.4.) beschrieben, isoliert. Als Elutionsmittel dient hier das Fließmittel A1 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser - 75:25:2,5). Der Trennungsvorgang wird einmal wiederholt. Die nach DC-Prüfung einheitlichen Fraktionen von VRA 8 werden vereinigt, eingeengt, durch Gelfiltration gereinigt und aus Wasser gefriergetrocknet. Es ergeben sich 38 mg Aucubin.

	Ausbeute (mg)	Ausbeute (%)
VRA 1a	80	0,016
VRA 1b	9	0,0018
VRA 2a	22	0,0044
VRA 2b	24	0,0048
VRA 3	115	0,023
VRA 4	360	0,072
Gesamt-Ecdysone	610	0,122
VRA 5	85	0,017
VRA 8	38	0,0076
Gesamt-Iridoide	123	0,0246

Tabelle 9: Zusammenstellung der aus 500 g Droge isolierten Ecdysone und Iridoide

2.2. Identifizierung

2.2.1. Eigenschaften von Pterosteron (VRA 1a)

Schmp.: 226-229°C

Summenformel: $C_{27}H_{44}O_7$

Mol.Gew.: 480,6

hRf-Werte: 60,5 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 75:25:2,5)

49,0 (Butanol/Toluol/Wasser 2:1:3)

45,0 (Toluol/Aceton 1:4)

UV:

λ_{max} 242 nm ε = 11200

IR:

792 m, 838 m, 870 m, 902 m, 928 m, 944 m, 972 m, 990 m, 1048 s, 1095 m, 1139 m, 1198 m, 1220 m, 1260 m, 1290 m, 1310 m, 1360 m, 1378 s, 1395 m, 1414 m, 1420 m, 1437 m, 1455 m, 1460 m, 1610 m, 1642 s, 2771 s, 2830 s, 2860 s, 3040 w, von 3100 - 3700 breite Chelatbande

NMR:

δ = 1,01 (d, 26/27-CH_3, J = 6 Hz), 1,06 (s, 19-CH_3), 1,19 (s, 18-CH_3), 1,57 (s, 21-CH_3), 1,86 (breit), 3,98 - 4,25 (m, 2/3/22/24-H), 6,23 (d, 7-H, J = 2 Hz), 6,14 (s, 14-OH).

MS: (rel. Intensität bis m/e 300 $\geq$ 10 %)

462 (0,1), 444 (1), 429 (0,5), 428 (1), 426 (1), 419 (0,5), 413 (0,5), 411 (0,5), 408 (0,5), 401 (1), 385 (1), 383 (1), 363 (10), 347 (14), 346 (16), 345 (23), 329 (12), 328 (10), 327 (18), 313 (5), 311 (8), 309 (8), 303 (7), 302 (6), 301 (13), 300 (7), 269 (18), 250 (14), 191 (11), 189 (10),

175 (14), 173 (26), 171 (10), 161 (18), 159 (13), 147 (19), 145 (18), 143 (23), 135 (13), 133 (13), 131 (16), 129 (13), 125 (18), 123 (21), 121 (25), 119 (14), 117 (12), 109 (12), 107 (16), 105 (37), 99 (10), 95 (21), 93 (33), 91 (76), 85 (23), 81 (43), 79 (37), 77 (38,), 73 (26), 71 (30), 69 (38), 67 (29), 57 (36), 56 (23), 55 (66), 53 (10), 45 (34), 43 (100), 41 (77).

Die IR-Spektren von VRA 1a und Pterosteron sind deckungsgleich.

2.2.2. Eigenschaften von Muristeron A (VRA 1b)

Schmp.: 176 - 180° und 234 - 236° C

Summenformel: $C_{27}H_{44}O_8$

Mol. Gew.: 496,6

hRf-Werte: 60,5 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 75:25:2,5)
49,0 (Butanol/Toluol/Wasser 2:1:3)
38,0 (Toluol/Aceton 1:4)

UV:

λ_{max} 233 nm ε = 11985

IR:

680 w, 705 w, 740 w, 795 w, 850 w, 872 m, 912 w, 946 w, 995 m, 1010 m, 1032 m, 1060 m, 1094 m, 1130 m, 1165 w, 1200 w, 1225 m, 1290 m, 1305 m, 1360 m, 1378 m, 1405 m, 1435 m, 1460 m, 1630 m, 1668 s, 1870 m, 1952 s, 3050 w, von 3100 bis 3700 breite Chelatbande.

NMR:

δ = 0,83 (d, 26/27-CH_3, J = 6 Hz), 1,23 (s, 18-CH_3), 1,38 (s, 19-CH_3), 1,53 (s, 21-CH_3), 2,0 (m), 2,8 (m), 2,97 (m),

3,7 - 4,18 (2/3/11/22-H), 6,23 (d, 7-H, J = 2,6 Hz), 6,47 (14-OH),6,66 (5-OH).

MS: (rel. Intensität bis m/e 360 > 10 %)
478 (1), 460 (5), 445 (3), 442 (8), 427 (3), 426 (4), 424 (4), 409 (5), 406 (3), 396 (2), 395 (1), 391 (4), 378 (4), 377 (10), 361 (13), 360 (30), 359 (100), 343 (19), 342 (13), 341 (31), 325 (16), 323 (35), 316 (10), 313 (12), 307 (11), 305 (11), 297 (13), 295 (20), 283 (11), 281 (20), 279 (15), 271 (24), 269 (14), 267 (12), 265 (14), 263 (13), 255 (16), 253 (18), 251 (13), 241 (21), 239 (16), 237 (16), 235 (12), 229 (15), 227 (22), 225 (20), 223 (14), 213 (19), 211 (21), 209 (17), 201 (19), 199 (24), 197 (22), 195 (19), 187 (19), 185 (21), 183 (21), 181 (18), 173 (18), 171 (19), 169 (18), 159 (16), 157 (16), 155 (15), 145 (31), 143 (19), 129 (16), 109 (23), 105 (13), 99 (11), 91 (11), 85 (12), 83 (35), 81 (11), 71 (15), 69 (14), 55 (26), 43 (30).

Mit authentischem Material wurde ein IR- und ein Massenspektrum angefertigt und mit denen von VRA 1b verglichen.
Die IR-Spektren sind deckungsgleich, die Peaks in den Massenspektren entsprechen sich.

2.2.2.1. Bildung von VRA 1b-Diacetonid-Acetat

30 mg Muristeron A werden in 6 ml Aceton p.a. gelöst und mit 0,45 ml einer 5 %igen acetonischen Phosphorsäuremolybdän-Lösung versetzt[92]. Nach 30minütigem Stehen erfolgt die Zugabe von 1,5 ml konz. Ammoniak und 24 ml Wasser. Nach der Aufarbeitung (siehe 2.2.6.3.) resultieren 36 mg, die zur Ace-

tylierung in 1 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 1 ml Essigsäureanhydrid versetzt werden. Reaktionsbedingungen und Aufarbeitung siehe 2.2.6.3.

Um das Hauptprodukt rein zu erhalten, wird das Reaktionsgemisch als Celite-Verreibung auf eine Kieselgelsäule (60 g, Ø 1,5 cm, Schichthöhe 56 cm) gebracht und mit Toluol/Aceton (4:1) eluiert. Bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 ml/Min. werden Fraktionen von 5 ml aufgefangen. Nach DC-Prüfung einheitliche Eluate ergeben nach dem Einengen i. V. 22 mg VRA 1b-Diacetonid-Acetat.

2.2.2.2. Eigenschaften von VRA 1b-Diacetonid-Acetat

Summenformel: $C_{35}H_{54}O_9$

Mol. Gew.: 618,7

NMR:

δ = 0,85 (d, 26/27-CH_3, J = 5 Hz), 1,05 (s, 18-CH_3), 1,235 (s, 6 H), 1,35 (s, 3 H), 1,42 (s, 3 H), 1,50 (s, 3 H), 1,63 (s, 3 H), 2,17 (s, Acetat-CH_3), 3,65 (dd, 9-H, J = 2,5 Hz, J = 9 Hz), 6,31 (d, 7-H, J = 2,5 Hz), 6,68 (5-OH).

MS: (rel. Intensität bis m/e 250 > 20 %)

604 (2), 603 (6), 558 (1), 543 (3), 540 (1), 526 (1), 525 (1), 484 (1, 5), 482 (1), 468 (2), 467 (2), 449 (2), 425 (3), 417 (2), 409 (3), 408 (4), 407 (6), 400 (2), 391 (3), 389 (3), 367 (4), 359 (3), 355 (3), 341 (5), 339 (5), 337 (4), 325 (6), 323 (6), 309 (6), 307 (5), 297 (7), 281 (9), 279 (11), 185 (73), 143 (20), 142 (31), 128 (22), 127 (79), 114 (21), 109 (100), 101 (23), 99 (29), 97 (30), 95 (29), 93 (21), 91 (32), 85 (52), 84 (74), 81 (44), 71 (40), 69 (93), 67 (32), 59 (73), 57 (69), 56 (74), 55 (72).

2.2.3. Eigenschaften von Ajugasteron C (VRA 2a)

Die Verbindung wurde gefriergetrocknet, da eine Kristallisation nicht möglich war.

Summenformel: $C_{27}H_{44}O_7$

Mol. Gew.: 480,6

hRf-Werte: 56,0 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 75:25:2,5)
49,0 (Butanol/Toluol/Wasser 2:1:3)
38,0 (Toluol/Aceton 1:4)

UV:

λ_{max} 241 nm ε = 10583

IR:

700 w, 722 w, 772 w, 820 w, 837 w, 870 w, 888 m, 925 m, 1000 m, 1027 m, 1060 s, 1110 m, 1133 m, 1168 m, 1210 m, 1230 m, 1253 m, 1275 m, 1285 m, 1319 m, 1328 m, 1346 m, 1368 m, 1385 s, 1442 m, 1466 m, 1507 w, 1521 w, 1531 w, 1540 w, 1558 w, 1595 m, 1628 s, 1648 s, 1655 s, 1700 m, 1780 w, 2660 w, 2720 w, 2875 m, 2955 s, 3040 w, von 3100 bis 3700 breite Chelatbande.

NMR:

δ = 0,85 (d, 26/27-CH_3, J = 4,5 Hz), 1,24 (s, 19-CH_3), 1,30 (s, 18-CH_3), 1,53 (s, 21-CH_3), 1,82 - 2,03 (m), 2,79 - 3,02 (m), 3,69 - 3,77 (m), 3,80 - 3,88 (m), 4,14 - 4,23 (m), 6,25 (s, 14-OH), 6,28 (d, 7-H, J = 1,6 Hz).

MS: (rel. Intensität bis m/e 300 > 20 %)

462 (1), 444 (3), 429 (2), 426 (4), 411 (2), 400 (2), 393 (2), 379 (8), 377 (4), 362 (5), 361 (23), 360 (12), 359 (18), 345 (9), 344 (25), 343 (67), 342 (14), 341 (20), 327 (13),

326 (20), 325 (58), 323 (10), 317 (9), 309 (13), 307 (14), 301 (9), 300 (13), 267 (43), 213 (20), 187 (28), 185 (20), 173 (27), 171 (25), 145 (26), 143 (38), 115 (20), 111 (43), 109 (30), 105 (24), 99 (30), 97 (24), 95 (30), 91 (22), 85 (25), 83 (29), 81 (34), 71 (32), 69 (30), 68 (43), 67 (22), 57 (30), 56 (22), 55 (51), 43 (100), 41 (51).

2.2.4. Eigenschaften von α-Ecdyson (VRA 2b)

Die Verbindung wurde gefriergetrocknet.

Summenformel: $C_{27}H_{44}O_6$

Mol. Gew.: 464,6

hRf-Werte: 56,0 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 75:25:2,5)

42,0 (Butanol/Toluol/Wasser 2:1:3)

30,5 (Toluol/Aceton 1:4)

UV:

λ_{max} 242 nm $\varepsilon = 12455$

IR:

815 w, 855 w, 890 m, 920 m, 945 m, 960 m, 975 m, 1008 m, 1064 s, 1130 m, 1152 m, 1214 m, 1232 m, 1272 m, 1286 m, 1320 s, 1386 s, 1448 m, 1465 m, 1500 w, 1509 w, 1521 w, 1542 w, 1560 w, 1610 m, 1630 s, 1645 s, 1650 s, 1657 s, 1698 m, 2660 w, 2880 m, 2940 s, 2962 s, 3020 w, von 3100 bis 3700 breite Chelatbande.

NMR:

δ = 0,73 (s, 18-CH_3), 1,09 (s, 19-CH_3), 1,25 (d, 21-CH_3, J = 6,3 Hz), 1,37 (s, 26/27-CH_3), 6,18 (s, 14-OH), 6,18 (d, 7-H, J = 2 Hz).

MS: (rel. Intensität bis m/e 300 >10 %)

446 (3), 431 (3), 429 (3), 428 (9), 418 (5), 413 (5), 410 (2), 400 (3), 395 (3), 377 (5), 360 (3), 359 (5), 349 (6), 348 (21), 341 (4), 333 (7), 331 (8), 330 (19), 315 (18), 302 (7), 301 (13), 300 (15), 279 (35), 251 (10), 250 (30), 249 (27), 232 (10), 231 (14), 213 (11), 210 (11), 209 (10), 187 (10), 185 (10), 175 (11), 173 (17), 171(10), 161 (16), 159 (13), 157 (10), 147 (14), 145 (14), 140 (14), 135 (11), 131 (12), 129 (10), 126 (27), 121 (17), 119 (13), 117 (15), 109 (16), 107 (14), 105 (16), 99 (100), 95 (17), 93 (18), 91 (18), 81 (71), 79 (14), 70 (16), 69 (38), 59 (28), 55 (38), 43 (37), 41 (25).

Mit authentischem Material wurde ein IR- und ein Massenspektrum angefertigt und mit denen von VRA 2b verglichen. Die IR-Spektren sind deckungsgleich und die Peaks in den Massenspektren entsprechen sich.

2.2.5. Eigenschaften von Polypodin B (VRA 3)

Schmp.: 253 - 255° C

Summenformel: $C_{27}H_{44}O_8$

Mol. Gew.: 496,6

hRf-Werte: 53,0 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 75:25:2,5)
35,0 (Butanol/Toluol/Wasser 2:1:3)
25,0 (Toluol/Aceton 1:4)

UV:

λ_{max} 242 nm ε = 11800

IR:

700 m, 725 w, 816 w, 830 w, 856 w, 890 m, 915 m, 940 m, 960 m, 982 m, 1012 m, 1023 m, 1045 m, 1070 s, 1110 m, 1148 s, 1215 m, 1235 m, 1270 m, 1282 m, 1302 m, 1320 m, 1385 s, 1408 m, 1425 m, 1440 m, 1462 m, 1510 w, 1522 w, 1542 w, 1560 w, 1576 w, 1625 m, 1650 m, 1662 s, 1682 s, 1715 w, 1730 w, 1770 w, 1875 m, 1940 s, 1960 s, 3040 w, von 3100 bis 3700 breite Chelatbande.

NMR:

δ = 1,09 (s, 19-CH_3), 1,15 (s, 18-CH_3), 1,35 (s, 26/27-CH_3), 1,52 (s, 21-CH_3), 3,65 - 3,8 (m), 4,0 - 4,18 (m), 6,20 (s, 14-OH, d, 7-H, J = 2 Hz), 6,68 (s, 5-OH).

MS: (rel. Intensität bis m/e 300 > 25 %, von m/e 300 bis m/e 380 > 10 %)

478 (1), 460 (2), 443 (4), 442 (13), 427 (5), 426 (5), 424 (7), 409 (6), 408 (4), 406 (3), 391 (3), 380 (10), 379 (28), 363 (19), 362 (24), 361 (54), 360 (21), 345 (24), 344 (24), 343 (30), 327 (26), 326 (26), 325 (36), 317 (17), 316 (24), 311 (13), 309 (16), 308 (12), 307 (11), 283 (30), 229 (26), 227 (28), 225 (27), 213 (26), 211 (29), 201 (26), 199 (40), 197 (38), 189 (36), 185 (26), 173 (34), 171 (29), 165 (27), 159 (28), 157 (28), 155 (27), 153 (36), 147 (27), 145 (28), 143 (40), 137 (26), 131 (32), 129 (30), 127 (26), 126 (33), 119 (27), 115 (28), 107 (27), 105 (36), 99 (72), 93 (26), 91 (44), 85 (27), 81 (60), 79 (27), 71 (26), 69 (40), 59 (48), 57 (28), 55 (52), 43 (100), 41 (40).

Die IR-Spektren von VRA 3 und Polypodin B sind deckungsgleich.

2.2.6. Eigenschaften von Ecdysteron (VRA 4)

Schmp.: 236 - 238° C

Summenformel: $C_{27}H_{44}O_7$

Mol. Gew.: 480,6

hRf-Werte: 48,6 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 75:25:2,5)

36,0 (Butanol/Toluol/Wasser 2:1:3)

UV:

λ_{max} 243 nm ε = 12346

IR:

695 m, 812 w, 850 w, 885 m, 900 m, 913 m, 938 m, 958 m, 1002 m, 1030 m, 1060 s, 1116 m, 1126 m, 1150 m, 1210 m, 1230 m, 1268 m, 1300 m, 1319 s, 1382 s, 1443 m, 1462 m, 1505 w, 1520 w, 1538 w, 1555 w, 1570 w, 1610 m, 1640 s, 1645 s, 1650 s, 1692 w, 1710 w, 1765 w, 1875 m, 1940 s, 1962 s, 3040 w, von 3100 bis 3700 breite Chelatbande.

NMR:

δ = 1,06 (s, 19-CH_3), 1,18 (s, 18-CH_3), 1,36 (s, 26/27-CH_3), 1,55 (s, 21-CH_3), 1,7 - 2,05 (m), 4,1 (m), 4,5 (m), 6,0 (s, 14-OH), 6,16 (d, 7-H, J = 2 Hz).

MS: (rel. Intensität bis m/e 350 > 20 %)

480 (1), 462 (1), 445 (4), 444(4), 430(5), 429(12), 427(10), 426 (26), 411 (8), 409 (3), 408 (9), 393 (5), 375 (4), 364 (25), 363 (88), 352 (12), 347 (30), 346 (84), 345 (88), 344 (55), 343 (20), 329 (24), 328 (40), 327 (83), 309 (22), 301 (30), 300 (37), 285 (30), 269 (39), 267 (24), 250 (28), 249 (21), 227 (21), 215 (20), 213 (20), 211 (20), 199 (22),

197 (20), 191 (22), 185 (20), 175 (21), 173 (44), 171 (26), 161 (23), 159 (23), 157 (23), 155 (24), 147 (25), 145 (35), 143 (59), 133 (20), 131 (29), 129 (24), 128 (20), 126 (20), 125 (35), 121 (36), 119 (26), 117 (24), 113 (20), 109 (24), 107 (29), 105 (38), 100 (23), 99 (100), 97 (20), 95 (30), 93 (35), 91 (44), 85 (45), 83 (28), 81 (90), 79 (34), 77 (22), 72 (21), 71 (70), 69 (70), 67 (28), 59 (28), 58 (22), 57 (65), 56 (50), 55 (82), 53 (22), 45 (25), 44 (20), 43 (95).

Die IR-Spektren von VRA 4 und Ecdysteron sind deckungsgleich.

2.2.6.1. Säureabbau von Ecdysteron (VRA 4)

5 mg Ecdysteron werden in 0,9 ml Wasser gelöst und mit 0,1 ml 5n HCl versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 5 Min. wird 1 Min. lang auf 40° C erwärmt und die wieder erkaltete Lösung direkt auf Kieselgelplatten mit 0,5 mm Schichtdicke aufgetragen. Nach sechsmaliger Entwicklung in Methylenchlorid/Aceton/Aethanol (8:2:1) können die getrennten Zonen entnommen werden. Das Kieselgel wird fünfmal mit 5 ml Methanol eluiert und die gesammelten Eluate i. V. eingeengt. Neben einigen Nebenprodukten sind die Abbauprodukte 1 (hRf = 49,4; Anfärbung mit Vanillinreagenz: gelbgrün) und 2 (hRf = 43,6; Anfärbung: grün) entstanden. Die Ausgangssubstanz (Ecdysteron) hat in diesem System einen hRf-Wert von 24,7.

2.2.6.2. Eigenschaften der Abbauprodukte 1 und 2

Summenformel: $C_{27}H_{40}O_5$ (es werden bei der Reaktion aus der Ausgangsverbindung zwei Moleküle Wasser abgespalten)[37)]

Mol. Gew.: 444,6

hRf-Werte: (nach sechsmaligem Entwickeln in dem Fließmittel Methylenchlorid/Aceton/Aethanol 8:2:1)

49,4 (Abbauprodukt 1)

43,6 (Abbauprodukt 2)

24,7 (Ausgangsverbindung: Ecdysteron)

UV:

λ_{max} 297 nm ε = 15360 (Abbauprodukt 1)

λ_{max} 243 nm ε = 15500 (Abbauprodukt 2)

2.2.6.3. Bildung von VRA 4-Diacetonid

50 mg Ecdysteron werden in 10 ml Aceton p.a. gelöst und mit 0,75 ml einer 5 %igen acetonischen Phosphorsäuremolybdän-Lösung versetzt[92)]. Nach 30minütigem Stehen erfolgt die Zugabe von 2,5 ml konz. Ammoniak und 40 ml Wasser. Es wird mit Aether ausgeschüttelt, die Aetherphase zunächst mehrmals mit 5 %iger Natriumkarbonat-Lösung, dann mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und i. V. eingeengt. Das Reaktionsprodukt (58 mg) wird sofort weiterverarbeitet: Zugabe von 1,5 ml Pyridin (wasserfrei) und 1,5 ml Essigsäureanhydrid. Nach 24stündigem Stehen im Dunkeln bei Zimmertemperatur wird die Lösung auf 20 ml Eis gegossen und in der üblichen Weise (Ausschütteln mit Aether, Aetherphase waschen mit 0,1 n HCl, dann mit gesättigter

$NaHCO_3$-Lösung, schließlich mit Wasser, trocknen über Na_2SO_4 und i. V. einengen) aufgearbeitet. Die Prüfung (DC, NMR) des Reaktionsproduktes zeigt, daß lediglich ein Diacetonid gebildet wird, eine zusätzliche Acetylierung ist jedoch unter diesen Bedingungen nicht möglich.
Zur Entfernung der gebildeten Nebenprodukte wird der eingeengte Rückstand (52 mg) als Celite-Verreibung an einer Kieselgelsäule (60 g, Ø 1,5 cm, Schichthöhe 56 cm) aufgetrennt. Eluiert wird mit Toluol/Aceton (4:1) bei einer Tropfgeschwindigkeit von 1 ml/Min. Jeweils 5 ml Eluat werden aufgefangen. Nach DC-Prüfung einheitliche Fraktionen werden vereinigt und eingeengt. Es resultieren 45 mg VRA 4-Diacetonid.

2.2.6.4. Eigenschaften von VRA 4-Diacetonid

Summenformel: $C_{33}H_{52}O_7$
Mol. Gew.: 560,7

NMR:

δ = 0,985 (s, CH_3), 1,0 (s, CH_3), 1,34 (s, 4 x CH_3), 1,44 (s, CH_3), 1,53 (s, 2 x CH_3), 6,18 (s, 14-OH, d, 7-H, J = 1,6 Hz).

2.2.7. Eigenschaften von Agnusid (VRA 5)

Die Substanz wurde gefriergetrocknet.
Summenformel: $C_{22}H_{26}O_{11}$
Mol. Gew.: 466,4
hRf-Werte: 40,6 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 75:25:2,5)
35,0 (Essigester/Methanol/Wasser 85:15:12,5)
40,0 (Butanol/Toluol/Wasser 2:1:3)

IR:

696 m, 758 s, 838 m, 853 m, 873 w, 890 w, 902 w, 937 w, 964 m, 995 s, 1010 s, 1048 s, 1073 s, 1100 s, 1125 s, 1163 s, 1234 s, 1272 s, 1308 s, 1323 m, 1352 m, 1363 m, 1382 m, 1446 s, 1452 m, 1505 m, 1535 w, 1550 w, 1583 m, 1600 s, 1634 m, 1640 m, 1650 m, 1685 s, 1692 s, 1815 w, 1915 w, 2675 m, 2690 m, 2860 s, 2882 s, 2900 s, 3000 m, von 3010 bis 3650 breite Chelatbande.

Vergleich von VRA 5 mit authentischem Material:

1. durch DC in drei verschiedenen Systemen
2. durch IR.

Die beiden IR-Spektren sind deckungsgleich.

2.2.8. Eigenschaften von Aucubin (VRA 8)

Die Substanz wurde gefriergetrocknet.

Summenformel: $C_{15}H_{22}O_9$

Mol. Gew.: 346,3

hRf-Werte: 20,0 (Methylenchlorid/Methanol/Wasser 75:25:2,5)
10,0 (Essigester/Methanol/Wasser 85:15:12,5)
15,0 (Butanol/Toluol/Wasser 2:1:3)

IR:

755 m, 815 m, 835 m, 874 m, 895 m, 918 m, 958 s, 1010 s, 1040 s, 1075 s, 1135 s, 1190 m, 1375 s, 1450 m, 1500 w, 1515 w, 1532 w, 1550 w, 1635 m, 1642 m, 1675 m, 1690 w, 1708 w, 1725 w, 1760 w, 2080 w, 2640 w, 2695 w, 2730 w, 2750 w, 2870 m, 2900 m, von 3000 bis 3700 breite Chelatbande.

Der Vergleich mit authentischem Material erfolgte durch DC in drei verschiedenen Systemen und durch IR.

V. DISKUSSION

In der Einleitung wurden zwei Stoffgruppen hervorgehoben, die für eine chemotaxonomische Beurteilung der Vitex-Arten von Bedeutung sein können: Ecdysone und Iridoide. Bei den aus der hydrophilen Fraktion des Drogenextraktes von Vitex-rubro-aurantiaca De Wild. isolierten Inhaltsstoffe 1a, 1b, 2a, 2b, 3 und 4 handelt es sich um Phytoecdysone mit einem C_{27}-Grundgerüst. Die Verbindung 4 (Ecdysteron) kommt auch in Vitex megapotamica[29], V. sereti und V. rehmanni[25] vor, die Verbindungen 1a (Pterosteron) und 3 (Polypodin B) sind nur in V. megapotamica[31] nachgewiesen. Neu in der Gattung sind die Verbindungen 1b (Muristeron A), 2a (Ajugasteron C) und 2b (α- Ecdyson). Interessant in diesem Zusammenhang ist, daß Ajugasteron C bisher nur in der den Verbenaceae verwandten Familie der Lamiaceae und zwar in Ajuga-Arten gefunden wurde. Daraus jedoch Hinweise über chemotaxonomische Zusammenhänge abzuleiten, erscheint mir, durch die bisherige Einmaligkeit bedingt, noch nicht möglich, obwohl von manchen Autoren (siehe EL-GAZZAR und WATSON[98]) versucht wird, bei der Neugliederung der beiden Familien die Unterfamilie der Viticoideae zusammen mit verschiedenen Labiatae-Unterfamilien (hierin auch Ajuga) einer gemeinsamen Gruppe zuzuordnen. Vielmehr wird dadurch die nahe Verwandtschaft innerhalb der Ordnung der Lamiales bestätigt und das Spektrum der gemeinsamen chemischen Merkmale ergänzt. Die Verbindung 1b (Muristeron A) ist bisher nur aus den Samen einer Ipomoea-Art[96] (Convolvulaceae) bekannt. Systematisch steht diese Familie den Verbena-

ceae nicht so nahe wie die Lamiaceae. Sie ist jedoch in derselben Unterklasse der Asteridae und der Überordnung der Lamianae zu finden. α-Ecdyson scheint als taxonomisches Merkmal nicht geeignet zu sein. Es kommt häufiger vor, wenn auch immer in geringen Mengen. So ist es in vielen Farnen und sporadisch in höheren Pflanzen zu finden.

Obwohl die vier Vitex-Arten, in denen nunmehr Ecdysone nachgewiesen werden konnten, einen relativ kleinen Teil der gesamten Gattung umfassen, so können doch bereits interessante Zusammenhänge festgestellt werden. Bedingt durch das große Areal und die heterogene Ausgestaltung kann die sehr artenreiche Gattung in Untergattungen unterteilt werden, mit nochmaliger Unterteilung der umfangreichsten (siehe PIEPER[78]). Die Vitex-Arten V. megapotamica, V. sereti und V. rubro-aurantiaca werden der Subgenus Euvitex zugeordnet, während V. rehmanni zur Untergattung Holmskioldiopsis gezählt wird. Dies ist insofern interessant, als diese beiden Untergattungen phylogenetisch bis auf die Kelchentwicklung größere Übereinstimmung aufweisen, als dies gegenüber den anderen Subgenera der Fall ist[78]. Interessant ist ebenfalls, daß die drei zu Euvitex gerechneten Arten der Sektion Axillares zugeordnet sind. In den Arten der Sektion Terminales konnten bis heute noch keine Ecdysone nachgewiesen werden. Wichtig ist dabei die Tatsache, daß das Entwicklungszentrum der Terminales in Asien und das der Axillares vorwiegend in Afrika (eine Ausnahme ist V. megapotamica, beheimatet in Südamerika) zu finden ist. Da auch das Verbreitungsgebiet der Untergattung Holmskioldiopsis und somit auch die Art V. rehmanni im südafrikani-

schen Raum liegt, führt zu der Überlegung, ob in den vorwiegend afrikanischen Arten eher Ecdysone zu finden sind als in den asiatischen. Die Antwort muß zum jetzigen Zeitpunkt noch offen bleiben, da das Spektrum an untersuchten Pflanzen nach meiner Meinung nicht ausreicht, um eine chemotaxonomisch so wichtige Aussage zu machen. Zu erwähnen ist noch, daß innerhalb der vier besprochenen Arten zwischen den beiden V. sereti und V. rubro-aurantiaca eine sehr starke morphologische und geographische Verwandtschaft besteht.

Bei den Verbindungen 5 und 8 aus der untersuchten Vitex-Art handelt es sich um die Iridoide Agnusid (5) und Aucubin (8). Agnusid, meist begleitet von Aucubin, ist in folgenden acht Vitex-Arten bereits nachgewiesen: V. agnus castus, V. negundo, V. trifolia, V. lucens[19], V. megapotamica[26], V. pseudo-negundo, V. sereti und V. rehmanni[25]. Außer V. lucens (Subgenus Chrysomallum) und V. rehmanni (Subgenus Holmskioldiopsis) sind alle genannten Arten der Untergattung Euvitex zugeordnet. Somit sind in den bisherigen Untersuchungen nur zwei (die südamerikanische Pyrostoma und die asiatische Glossocalyx) der insgesamt fünf Untergattungen nicht erfaßt. Da jedoch sämtliche, dahingehend untersuchten Vitex-Arten Agnusidund häufig auch Aucubin enthalten, kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß es sich bei diesem Iridoidtyp um ein taxonomisches Merkmal der Gattung Vitex handelt.
Somit ist die Pflanze Vitex rubro-aurantiaca ein weiteres Beispiel einer ecdyson- und iridoidhaltigen afrikanischen Vitex-Art.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Aus Vitex rubro-aurantiaca konnte ein Extrakt gewonnen werden, der sechs Ecdysone und zwei Iridoide enthielt. Durch kombinierte Anwendung von SC, präparativer DC und Gelfiltration gelang es, die sechs, in ihrem chromatographischen Verhalten sehr ähnlichen Ecdysone und die beiden Iridoide rein zu isolieren. Dabei konnten die Verbindungen in Konzentrationen zwischen 0,072 und 0,0018 %, bezogen auf das Trockengewicht, erhalten werden.

Die Substanzen wurden durch spektroskopische Methoden charakterisiert und, ausgenommen VRA 2a, durch Vergleich mit authentischem Material identifiziert. Bei den Ecdysonen handelt es sich um folgende Verbindungen: Pterosteron (VRA 1a), Muristeron A (VRA 1b), Ajugasteron C (VRA 2a), α-Ecdyson (VRA 2b), Polypodin B (VRA 3) und Ecdysteron (VRA 4). Bei den Iridoiden wurde Identität mit Agnusid (VRA 5) und Aucubin (VRA 8) festgestellt.

Die chemotaxonomische Bedeutung der Ecdysone und Iridoide innerhalb der Verbenaceen und speziell innerhalb der Gattung Vitex wurde diskutiert.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1) E. STEINEGGER, R. HÄNSEL; Lehrbuch der Pharmakognosie 3. Aufl., S. 526 - 28, Springer Verlag 1972
2) K. BREITWIESER; Pharmakognostische Untersuchungen über Verbenaceen, Habilitationsschrift, Braunschweig 1942
3) K. D. SCHAAF; Dissertation FU Berlin 1964
4) N. K. BASU und G. B. SINGH; Quart. J. Pharm. Pharmacol. 20, 136 (1947)
5) W. DÖPKE; Naturwissenschaften 49, 375 (1962)
6) PHANA DOUK; Contribution à l'étude des plantes medicinales du Cambodge, Thèse (Pharm.) Univ. Paris 1966
7) A. G. PERKIN; J. chem. Soc. (London) 73, 1019 (1898)
8) W. H. EVANS und A. McGOOKIN; J. chem. Soc. (London), 3510 (1957)
9) C. B. RAO und V. VENKATESWARLU; J. sci. ind. Res. (New Delhi) 21 B, 313 (1962)
10) D. S. RAO; Naturwissenschaften 52, 262 (1965)
11) M. K. SEIKEL und T. J. MABRY; Tetrahedron Letters 1105 (1965)
12) M. K. SEIKEL et al.; Phytochemistry 5, 439 (1966)
13) M. L. BOUILLAT und J. CHOPIN; Compt. Rend. 273 C, 1759 (1971) 274 C, 193 (1972)
14) R. HÄNSEL und H. RIMPLER; Arch. Pharm. 296, 598 (1963)
15) H. RIMPLER; Dissertation FU Berlin (1964)
16) L. M. SIRAIT et al.; Experientia 18, 72 (1962)
17) L. M. SIRAIT; Dissertation FU Berlin (1961)
18) I. BELIC et al.; J. chem. Soc., 2523 (1961)
19) R. HÄNSEL et al.; Phytochemistry 4, 19 (1965)
20) Y. KIMURA et al.; J. Pharm. Soc. Japan 87, 1429 (1967)
21) M. GRESHOFF; Medeelingen uit's lands Plantentuin 25 Batavia's Gravenhage 1898, 158
22) E. WINDE; Dissertation FU Berlin (1959)
23) E. WINDE und R. HÄNSEL; Arch. Pharm. 293, 556 (1960)
24) R. HÄNSEL et al.; Arch. Pharm. 297, 493 (1964)
25) H. RIMPLER; Phytochemistry 11, 2653 (1972)
26) H. RIMPLER; Arch Pharm. 305, 746 (1972)
27) R. HEGNAUER; Pharm. Acta Helv. 41, 577 (1966)

28) L. J. BOURDIER; Pharm. Chim. 27, 49, 101 (1908)
29) H. RIMPLER und G. SCHULZ; Tetrahedron Letters 22, 2033 (1967)
30) H. RIMPLER; Pharm. Zeitung 112, 1799 (1967)
31) H. RIMPLER; Tetrahedron Letters 5, 329 (1969)
32) R. HEGNAUER; Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 6, Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart (1973)
33) E. GILDEMEISTER und F. HOFFMANN; Die Ätherischen Öle, 4. Aufl., Vol. VI (1961)
34) E. BECKER; Über Versuche zur Anreicherung und physiologischen Charakterisierung des Wirkstoffes der Puparisierung. Biol. Zbl. 61, 360 (1941)
35) A. BUTENANDT und P. KARLSON; Z. Naturforsch. 9b, 389 (1954)
36) P. KARLSON et al.; Liebigs Ann. Chem. 662, 1 (1963)
37) P. KARLSON et al.; Chem. Ber. 98, 2394 (1965)
38) R. HUBER und W. HOPPE; Chem. Ber. 98, 2403 (1965)
39) P. KARLSON; Vitamines and Hormones, 14, 227 (1956)
40) P. HOCKS und R. WIECHERT; Tetrahedron Letters 26, 2989 (1966)
41) H. HOFFMEISTER und H. F. GRÜTZMACHER; Tetrahedron Letters 33, 4017 (1966)
42) F. HAMPSHIRE und D. H. S. HORN; Chem. Commun. 2, 37 (1966)
43) M. N. GALBRAITH et al.; Naturwissenschaften 34, 471 (1967)
44) M. N. GALBRAITH et al.; Chem. Commun. 83 (1968)
45) M. J. THOMPSON et al.; Chem. Commun. 650 (1967)
46) K. NAKANISHI et al.; Chem. Commun. 915 (1966)
47) T. TAKEMOTO et al.; Yakugaku Zasshi 87, 325 (1967)
48) S. IMAI et al.; Chem. Pharm. Bull. (Japan) 17, 335 (1969)
49) T. TAKEMOTO et al.; Chem. Pharm. Bull. (Japan) 21, 2336 (1973)
50) H. HIKINO und T. TAKEMOTO; Naturwissenschaften 59, 91 (1972)
51) S. IMAI et al.; Chem. Pharm. Bull. (Japan) 17, 340 (1969)
52) T. TAKEMOTO et al.; Tetrahedron Letters, 3191 (1967)
53) G. M. WASSEL und S. S. AHMED; Pharmazie 29, 540 (1974)
54) S. IMAI et al.; Chem. Commun., 546 (1969)
55) S. IMAI et al.; Chem. Commun., 82 (1969)
56) RAPHAEL IKAN und UZI RAVID; Phytochemistry 10, 1659 (1971)
57) V. Z. USMANOV et al.; Chem. Nat. Comp. 6, 520 (1971)
58) T. TAKEMOTO et al.; Tetrah. Letters 39, 4199 (1968)
59) S. IMAI et al.; Tetrah. Letters 36, 3887 (1968)

60) S. IMAI et al.; Tetrah. Letters 36, 3883 (1968)
61) G. B. RUSSEL und J. G. FRASER; Austr.J. Chem. 26, 1805 (1973)
62) M. N. GALBRAITH et al.; Chem. Commun., 83 (1968)
63) R. WIECHERT; Angew. Chem., 82, 331 (1970)
64) P. KARLSON; Rev. Pure Appl. Chem. 14, 75 (1967)
65) P. HOCKS et al.; Angew. Chem. 78, 680 (1966)
66) M. N. GALBRAITH et al.; Austr. J. Chem. 22, 1059 (1969)
67) J. JIZBA et al.; Tetrah. Letters 51, 5139 (1967)
68) D. B. CARLISLE und P. E. ELLIS; Science 159, 1472 (1968)
69) T. TAKEMOTO et al.; Chem. Pharm. Bull. 16, 762 (1968)
70) H. HOFFMEISTER; J. Am. Oil Chemists Soc. 47, 71A (1970)
71) L. H. BRIGGS et al.; Tetrah. Letters, 69 (1963)
72) P. L. GEIGER; Liebigs Ann. Chem. 14, 206 (1835)
73) W. SCHUNK; Liebigs Ann. Chem. 66, 174 (1848)
74) H. LUDWIG; Arch. Pharm. 186, 64 (1868)
75) H. RIMPLER und H. PISTOR; Z. Naturforsch. 29c, 368 (1974)
76) D. GRÖGER und P. SIMCHEN; Pharmazie 22, 315 (1967)
77) J. BRIQUET; in ENGLER und PRANTL, "Natürl. Pflanzenfamilien" Bd. IV, 3a, 136 ff. (1897)
78) W. PIEPER; Dissertation Berlin (1928)
79) H. MOLDENKE; Phytologia 6, 117 (1957)
80) E. de WILDEMANN; Plant.Bequaert Vol. V, 5-7, 15-16 (1929)
81) N. J. de SOUZA et al.; Biochem. J. 114, 895 (1969)
82) N. J. de SOUZA et al.; Phytochem. 9, 1247 (1970)
83) P. KARLSON und H. HOFFMEISTER; Z. Physiol. Chem. 331, 298 (1963)
84) H. H. SAUER et al.; Phytochem. 7, 2027 (1968)
85) H. HIKINO et al.; Chem. Pharm. Bull. 17, 415 (1969)
86) H. HIKINO et al.; Phytochem. 9, 367 (1970)
87) P. MASNER und W. HANGARTNER; Experientia 29, 1550 (1973)
88) K. NAKANISHI und M. KORREDA; Tetrah. Letters 9, 1105 (1968)
89) R. F. ZÜRCHER; Helv. Chim. Acta 232, 2054 (1963)
90) F. BONADIES et al.; Gazz. Chim. Ital. 104, 17 (1974)
91) P. ESPOSITO und M. GUISO; Gazz. Chim. Ital. 103, 517 (1973)
92) H. MORI et al.; Chem. Pharm. Bull. 15, 460, 466 (1967)
93) G. HEINRICH und H. HOFFMEISTER; Tetrah. Letters 58, 6063 (1968)

94) G. B. RUSSEL et al.; Austr. J. Chem. 25, 1935 (1972)
95) T. TAKEMOTO et al.; Tetrah. Letters 3, 375 (1968)
96) L. CANONICA et al.; Chem. Commun., 1060 (1972)
97) T. TAKEMOTO et al.; Z. Naturforsch. 22b, 681 (1967)
98) A. EL-GAZZAR und L. WATSON; New Phytologist 67, 739-43 (1968); 69, 451-86, 478-92 (1970)
99) G. HEINRICH und H. HOFFMEISTER; Experientia 23, 995 (1967)
100) J. N. KAPLANIS et al.; Science 157, 1436 (1967)
101) E. STAHL; Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., S. 85 (1967)
102) soweit für die Deutung der Spektren keine spezielle Literatur angegeben ist, wurden folgende Bücher verwendet:
a) D. H. WILLIAMS und I. FLEMING; Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971)
b) W. SIMON und T. CLERC; Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Akadem. Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main (1967)
c) J. SEIBL; Massenspektrometrie, Akadem. Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main (1970)
d) T. CLERC und E. PRETSCH; Kernresonanzspektroskopie Akadem. Verlagsgesellschaft Frankfurt/Main (1970)

VIII. LEBENSLAUF

Am 6. Mai 1941 wurde ich als Sohn der Eheleute Ulrich Irion und Helene Irion, geb. Jäck in München geboren.
1943 verließen wir München und zogen nach Blaubeuren/Gerhausen, wo ich mit sieben Jahren 1948 in die Grundschule eintrat. Im August 1950 zogen wir nach Oberkochen. Nach zwei Jahren auf der dortigen Grundschule besuchte ich bis zur 7. Klasse die Freie Waldorfschule in Heidenheim/Brenz. Im Frühjahr 1960 machte ich die Aufnahmeprüfung in die 7. Klasse des Gymnasiums Korntal, blieb dort ein Jahr und verbrachte meine letzten zwei Schuljahre im Internat Urspring bei Schnelklingen, wo ich 1963 das Abitur ablegte.

Danach begann ich mein Pharmaziepraktikum in der Apotheke meines Vaters, mit Abschluß durch die pharmazeutische Vorprüfung im Herbst 1965 in Stuttgart. Nach einem halben Jahr Tätigkeit als vorexaminierter Apotheker in meiner Lehrapotheke begann ich im Sommersemester 1966 an der Philosophisch-Theologischen Hochschule in Passau das Studium der Pharmazie. Nach einem Semester wechselte ich an die Freie Universität Berlin und legte hier nach insgesamt sechs Semestern die Pharmazeutische Prüfung ab.
Danach war ich ein halbes Jahr als Kandidat in der Falken-Apotheke in Berlin beschäftigt.

Seit Januar 1970 beschäftige ich mich mit der vorliegenden Arbeit unter der Leitung von Herrn Professor Dr. H. Rimpler am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität Berlin.

Seit 1. März 1970 bin ich am gleichen Institut als Tutor beschäftigt.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198